INFORME FINAL TÉCNICO PROYECTO "PRODUCTORES DE LULO Y MORA COMPETITIVOS MEDIANTE SELECCIÓN PARTICIPATIVA DE CLONES ÉLITE, MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO Y FORTALECIMIENTO DE CADENAS DE VALOR FONTAGRO MORA LULO"

Organismo Ejecutor
Centro Internacional de Agricultura Tropical **-CIAT-**

Organizaciones Colaboradoras

COLOMBIA

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria **CORPOICA**
Universidad Santa Rosa de Cabal **UNISARC**
Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira **UNAL**
Corporación Centro Provincial de Gestión Agropecuaria del Sur del Departamento del Huila **AGROSUR**

ECUADOR

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias **INIAP**

FINANCIADO POR:
Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria, FONTAGRO

Palmira, Enero de 2010

EQUIPO PARTICIPANTE DEL PROYECTO

COLOMBIA

CIAT

Alonso González
Juan Fernando Mejía
Adriana Arenas
Lucía Afanador
Fernando Rodríguez
Pedro Pablo Parra
Elizabeth Álvarez
Germán Llano
Lina Arango
Tatiana Ovalle
Luis Armando Muñoz
Ana Cecilia Romero

CORPOICA

Mario Lobo Arias
Clara I Medina C
María Vargas
John Jairo Aguirre M
Germán Franco
Oscar Delgado
Abelardo Osorio

UNISARC

Elizabeth Villamil Castañeda
Juan Pablo Valencia
Diana Carolina Agudelo
Andrés Leonardo Franco
Nicolás Álzate Ocampo
Natalia Acevedo Bernal
Vicente Vaca
Carolina Zuleta Barco
Jesús Zuleta Ospina
Diana Milena González
Cristian David Santacoloma
Adrián Mauricio Valencia
Jefferson Flórez Mejía
Leidy Milena Romero
Carlos Felipe Botero

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA-SEDE PALMIRA

Jaime Eduardo Muñoz
Ana Milena Caicedo
Pedro Antonio Zapata
Diego Fernando Marmolejo Cortes
Herney Darío Vásquez Amariles
Edward Andrés Perengüez

CORPORACIÓN CENTRO PROVINCIAL DE GESTIÓN AGROEMPRESARIAL DEL SUR DEL DEPARTAMENTO DEL HUILA AGROSUR

Marco William Fonseca Díaz
Esperanza Amaya
Adriana Amaya

ECUADOR

INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP)

Wilson Vásquez
Beatriz Brito
Evelyn Viteri N.
Amanda Chiluisa
J. Navarrete
Jorge Revelo
Martínez A
Pablo Viteri
Félix Bastidas
Saulo de Jesús Soria.
Jenny Herrera
Cristina Sosa
Garrido P
Juan León
Franklin Valverde
Lucía Manangón
Diego Cárdenas
Patricio Gallegos
Villares M.
Priscila López
Paúl Gómez
José Ochoa
Eduardo Morillo
William Viera
Asaquibay C.

Contenido

1. RESUMEN EJECUTIVO 6

2. RESULTADOS OBTENIDOS Y SU INTERPRETACIÓN 9

2.1.1. Evaluación de Apomixis en Germoplasma Seleccionado de Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) 9

2.1.2. Reconocimiento y evaluación de enemigos naturales asociados a perla de la tierra Eurhizoccocus colombianus Jakubsky (1965) en tres zonas productoras de mora 30

2.1.3. Establecimiento de un protocolo para la multiplicación vegetativa de plántulas inoculadas con hongos biocontroladores como valor agregado y como estrategia preventiva para el manejo integrado de plagas y enfermedades en campo.....37

2.1.4. Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de mora en el Valle del Cauca. 47

2.1.5. Antracnosis de la mora de Castilla (R*ubus Glau*cus Benth): Variabilidad en especies y razas del agente causante e identificación de fuentes de resistencia a la enfermedad. 66

2.1.6. Evaluación de alternativas de control biológico de Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides y Colletotrichum acutatum por antagonismo con Trichoderma spp. 84

2.1.7. Evaluación in-vitro del efecto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* nees*)*, para el control de antracnosis *(Colletotrichum gloeosporoides (*penz) penz. & sacc.) en el cultivo de mora (*Rubus glaucus* benth).....101

2.1.8. Selección de material genético promisorio proveniente de programas de mejoramiento, bancos de germoplasma existentes o colectados en campos de agricultores.....109

2.1.9. Análisis de características físicas, químicas y organolépticas de los frutos de lulo y mora y pruebas de aceptación con la industria y otros mercados (fresco, agroindustria y exportación).....115

2.1.10. Análisis de la diversidad genetica de la mora cultivada (*Rubus glaucus* benth) y especies emparentadas en zonas productivas del ecuador mediante marcadores moleculares.....126

2.1.11. Desarrollo de un programa de manejo integrado de botritis (*Botrytis cinerea)* en mora de castilla (*Rubus glaucus b.)*, en Bolívar y Tungurahua.....134

2.2.1. Caracterización molecular con marcadores RAMS de accesiones de lulo provenientes de ecuador.....146

2.2.2. Caracterización agro-morfológicamente de clones y segregantes de 39 cruzamientos interespecíficos de naranjilla para identificar materiales promisorios con características de resistencia y/o tolerancia a plagas y enfermedades, alta productividad y buena calidad del fruto. san francisco - la célica - pichincha, 2008 152

2.2.3. Identificación molecular y caracterización genética y patológica de *colletotrichum sp.* aislados de naranjilla *(Solanum quitoense lam),* tomate de árbol *(Solanum betaceum)* y chirimoya *(annona cherimola mill)* provenientes de zonas productoras en ecuador.....179

2.2.4. Manejo de la nutrición del cultivo de naranjilla *(Solanum quitoense lam.)* en las zonas de producción de la región amazónica y noroccidente de Pichincha 187

2.2.5. Evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *Neoleucinodes elegantalis* (G.). Tumbaco – Pichincha.....195

2.2.6. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *quitoense* en la Sección Lasiocarpa.....204

2.2.7. Evaluación agronómica y resistencia a nemátodos *(Meloidogyne incógnita)* y al hongo *(Fusarium oxysporum)* de dos variedades de naranjilla injertas en siete accesiones de la Sección L asiocarpa noroccidente –pichincha.....212

2.2.9. Evaluación de reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de naranjilla *(Solanum quitoense. híbrido puyo*). San Miguel de los Bancos- pichincha.....228

2.2.10. Prospección de enemigos naturales del barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis* (guenée)) de la naranjilla (*Solanum quitoense*) y evaluación de la incidencia de las plagas en su cultivo.....233

2.2.11. Especies del nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne* sp.) asociadas a la naranjilla (*Solanum quitoense* lam) en ecuador.....248

2.2.12. Determinación de las características fisicoquímicas y estudio de los índices de calidad en el comportamiento postcosecha de los materiales seleccionados en clones élite provenientes de cruzamientos de naranjilla 254

2.2.14. Metodología *in vitro* para la evaluación de germoplasma de lulo *Solanum* spp. bajo la presión de toxinas de *Colletotrichum acutatum*.....294

2.2.15. Caracterización morfoagronómica de 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense * Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda.....300

2.2.16. Caracterización morfoagronómica de 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense * Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda.....303

2.2.17. Respuesta diferencial a la incidencia de los principales problemas fitosanitarios en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam, S. *quitoense * s. hirtum* bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda. 307

2.2.18. Respuesta a la incidencia, severidad e infestación de los principales problemas fitosanitarios en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam, bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda.....310

2.2.19. Evaluación de rendimiento y calidad en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense y S. quitoense * S hirtum* en el departamento de Risaralda.....313

2.2.20. Evaluacion de variables de rendimiento y calidad en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* lam en el departamento de risaralda. 319

2.2.22. Evaluacion del efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis (*Colletotrichum spp*) en el cultivo de lulo la selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum)*.....335

2.3.1. IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE PLANTAS IN VITRO DE LULO A BAJO COSTO CON PRODUCTORES. 343

2.3.2. SOCIALIZACIÓN DEL PROYECTO Y FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES 344

2.3.3. SISTEMAS DE INNOVACIÓN FUNCIONALES PARA LAS CADENAS DE LULO Y MORA DE COLOMBIA Y ECUADOR ESTABLECIDOS, CONSOLIDADOS Y FORTALECIDOS 345

2.3.4. LÍNEA BASE LEVANTADA PARA LOS CULTIVOS DE MORA Y LULO EN COLOMBIA Y ECUADOR.....346

2.3.5. ANÁLISIS ECONÓMICO PARA LOS CULTIVOS DE MORA Y LULO 347

3. ANÁLISIS PROSPECTIVO 350

4. PUBLICACIONES Y OTROS PRODUCTOS.....356

5. EJECUCIÓN DEL PRESUPUESTO 362

6. AGRADECIMIENTOS.....362

Anexos

Anexo 1: *Pasaportes Colletotrichum y mora.*
Anexo 2: *Implementación de un laboratorio de producción de plantas in vitro de lulo a bajo costo con productores*
Anexo 3: *Estadísticas eventos y talleres Fontagro Mora Lulo*
Anexo 4: *Informe GIAR - Fontagro*
Anexo 5: *Línea base de la mora de castilla Ecuador*
Anexo 6: *Línea base mora y lulo Colombia*
Anexo 7: *Análisis Económico Cultivo de Naranjilla, Ecuador*
Anexo 8: *Análisis Económico Cultivo de Lulo, Colombia*
Anexo 9: *Análisis Económico Cultivo de Mora, Colombia*
Anexo 10: *Tecnología cultivo mora, Colombia*
Anexo 11: *Tesis: Evaluación de alternativas de control in vitro de Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum acutatum y Botrytis cinérea.*
Anexo 12: *Especies de Colletotrichum asociadas con la antracnosis de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en el Valle del Cauca.*
Anexo 13: *Evaluación agronómica de materiales de lulo Solanum sp, frutal de alto potencial para zonas tropicales.*

1. RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto ***"Productores de lulo y mora competitivos mediante selección participativa de clones élite, manejo integrado del cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor FONTAGRO mora lulo"*** se llevó a cabo desde el año 2007 hasta el 2010. El objetivo general fue optimizar la productividad y calidad de lulo *(Solanum quitoense)* y mora *(Rubus glaucus)* para fortalecer las cadenas de valor, mejorar los ingresos de los cultivadores y proteger el ambiente, mediante la selección de materiales élite y el manejo integrado de los cultivos. El desarrollo del mismo se enfocó en los siguientes objetivos específicos: (1) Con la participación de los agricultores, empresas comercializadoras y procesadoras seleccionar materiales élite de lulo y mora, con criterios de adaptabilidad, resistencia a enfermedades, productividad y aceptación del mercado. (2) Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia. (3) Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes. (4) Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados. (5) Fortalecer la capacidad de agricultores y técnicos en el manejo integrado de los cultivos de mora, lulo y desarrollar capacidades de innovación en los actores de las cadenas productivas. (6) Establecer y fortalecer sistemas de innovación para el desarrollo de los cultivos de mora y lulo en Colombia y Ecuador.

Las metas planteadas fueron: Caracterizar *30* nuevas accesiones de mora y *20* de lulo en los bancos de germoplasma. Seleccionar *10* clones élite de mora y *20* de lulo con alta productividad, calidad, resistencia a plagas y enfermedades y buenas características organolépticas con aceptación de la industria y el mercado fresco. Identificar de *3* clones de mora y lulo resistentes a antracnosis en un grupo de *60* clones de mora y *40* de lulo, de diferentes regiones de Colombia y Ecuador. Desarrollar metodologías de producción masiva de material de siembra sano de lulo y mora, de bajo costo, encontrar patrones resistentes, inductores de resistencia y antagonistas. Determinar la relación costo-beneficio de los clones élites de lulo y mora, bajo diferentes sistemas de producción dirigidos a diferentes mercados. Establecer y consolidar sistemas de innovación funcionales para las cadenas de mora y lulo de Colombia y Ecuador. Elaborar una guía metodológica de producción limpia de mora y lulo, dos artículos científicos en revistas nacionales y dos en revistas internacionales, dos cartillas y seis talleres de capacitación.

La metodología implementada en el proyecto, siguió el proceso de investigación y desarrollo pasando por cuatro fases: (1) selección participativa de material genético, (2) caracterización y evaluación del material genético de acuerdo a los criterios de los diferentes grupos de interés (productores, comercializadores, agroindustria, investigadores y técnicos), (3) desarrollo de pruebas regionales con grupos gestores de innovación conformados con representantes de los diferentes actores de la cadena productiva, y (4) capacitación y difusión de material genético y prácticas más efectivas de manejo integrado del cultivo.

Como resultados relevantes se destaca la caracterización de 71 accesiones de mora y 43 materiales de lulo en Colombia. En Ecuador, se caracterizaron 108 accesiones de mora y 100 híbridos interespecíficos de lulo. En ambos países se encontraron accesiones de mora con características superiores a las comerciales; 14 en Ecuador y 9 en Colombia. Del germoplasma de lulo; se destacaron 9 materiales en Colombia con potencial para programas de mejoramiento o producción comercial y 9 materiales en Ecuador provenientes de cruzamientos interespecíficos. Se realizó la caracterización molecular de 36 materiales de lulo colectados en Colombia y 51 accesiones colectadas en Ecuador. De esta forma se superó la meta identificando materiales superiores de mora y lulo, con características de rendimiento, calidad de fruta y/o resistencia a enfermedades, a partir de evaluaciones de laboratorio y campo.

En Ecuador se liberó la variedad de Naranjilla de jugo **INIAP- Quitoense 2009**, la cual es una selección de *Solanum quitoense* injertada sobre accesiones de *S. hirtum y S. arboreum*, tolerantes a *Meloidogyne incognita* y *Fusarium spp*. Esta variedad representa una innovación tecnológica al ser la primera variedad de naranjilla que se comercializa injertada sobre patrones con tolerancia a plagas y enfermedades. Esto está generando gran impacto ya que las evaluaciones en campo indican que permite reducir el uso de pesticidas, por lo tanto incide en la protección de la salud humana, el suelo y el medio ambiente en general. Adicionalmente, el análisis económico de esta tecnología indica una tasa de retorno cercana al 300% por encima de la práctica comercial utilizada actualmente.

En Colombia se generaron alternativas de propagación masiva de material de siembra con calidad genética y fitosanitaria, de bajo costo para productores. Se estableció en una de las regiones con más tradición en el cultivo de mora la metodología e instalaciones de multiplicación masiva por estacas enraizadas con *Trichoderma*, las cuales presentaron un mayor porcentaje de brotes, raíces y una tendencia a que se produzcan más plántulas. Entre las ventajas que tiene esta metodología con relación a la que usan los agricultores de la zona son la mayor productividad, obtención de plantas sanas y la no propagación de la perla de tierra (*Eurhizoccocus colombianus*). Se desarrollaron sistemas de propagación *in vitro* de lulo a bajo costo, implementando un laboratorio de propagación de materiales con la organización de productores ASLUBEL. Se logró el apalancamiento con otras instituciones para continuar con el trabajo.

Se evaluó el modo reproductivo de ocho ecotipos de mora de castilla, los cuales presentaron apomixis facultativa con tendencia a la sexualidad y alta viabilidad polínica entre ellos. De acuerdo a las variaciones encontradas en la emergencia; el ecotipo, tratamiento y ambiente influyen en la emergencia de las semillas. Esto sugiere que debe tenerse cuidado en la multiplicación a partir de semilla porque los ecotipos se reproducen principalmente de forma sexual y la mayoría de las plántulas no conservarían las características de la planta madre.

Se establecieron colecciones de aislamientos y se hizo caracterización molecular, morfológica y patológica de los agentes causales de las principales enfermedades. Se dispone del ADN de 23 cepas de *Colletotrichum sp.,* caracterizadas molecularmente para conocer la variabilidad genética. Se aislaron hongos de los géneros *Beauveria, Asperguillus y Verticillium*, bacterias del género *Bacillus* y *Paenibacillus*, dos virus de ADN de cadena simple circular y el parasitoide *Copidosoma sp.,* que están controlando algunas plagas de la naranjilla en el Noroccidente de Pichincha. En Colombia, se identificaron y evaluaron controladores biológicos y antagonistas para las principales plagas y enfermedades, los cuales será necesario incluir en programas de manejo integrado de los cultivos. Se evaluaron productos fitoquímicos mediante pruebas de biocontrol para el manejo de antracnosis en mora y lulo bajo condiciones de laboratorio y campo en la zona del eje cafetero. Se encontró que los agentes causales de antracnosis son *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*, teniendo mayor incidencia este último. 240 cepas de *Colletotrichum spp.,* se caracterizaron molecularmente y 50 clones de mora se evaluaron por resistencia a antracnosis, encontrándose 4 resistentes y 46 susceptibles.

Para el control de la perla del suelo en mora (*Eurizococcus colombianus*), las cepas de *M. anisopliae* aisladas de adultos y ninfas de perla se convierten en una alternativa viable para el manejo de poblaciones de *E. colombianus*. Estos resultados son impactantes ya que hasta el momento solo se disponía del control químico, pero ha sido inefectivo por la presencia de la cera que recubre los estadíos ninfales de *E. colombianus*, y por encontrarse entre 10 a 30 cm de profundidad.

Se construyó y actualizó la línea base para los cultivos de mora y lulo, en Ecuador y Colombia. Se consolidaron sistemas de innovación multi-actor funcionales para las cadenas de mora y lulo. Como instrumento de innovación se conformaron tres grupos GIAR (*Gestores de Innovación en la Agroindustria Rural*). La experiencia fue exitosa porque pudo generar en poco tiempo (2 años) procesos de autogestión, de co-innovación entre los actores y toma de decisiones por parte de la asociación de productores de APROMORA[1] y ASLUBEL[2]en Colombia y de diferentes asociaciones de los cantones de la provincia de Tungurahua en Ecuador. Se establecieron redes sociales y de trabajo conjunto con instituciones como SENA, ICA, CORPOICA, COMITÉ DE CAFETEROS, Universidad Católica de Oriente (UCO), Universidad Nacional (UNAL), Instituto de Investigación AgResearch (Nueva Zelanda) y todos los departamentos técnicos del INIAP en Ecuador.

Se realizaron 33 eventos de capacitación y divulgación de los resultados en los cuales participaron alrededor de 1713 personas. Se cuenta con guías metodológicas para la producción limpia de lulo y mora. Se desarrollaron 36 trabajos de investigación como tesis de pregrado, maestría y doctorado, 20

[1]Asociación de Productores de Mora
[2]Asociación de Productores de Lulo del Municipio de Belén de Umbría.

publicaciones entre artículos científicos (Algunos se encuentran en proceso de publicación), cartillas, guías y póster.

2. RESULTADOS OBTENIDOS Y SU INTERPRETACIÓN

2.1. RESULTADOS EN MORA

2.1.1. Evaluación de Apomixis en Germoplasma Seleccionado de Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)[3]

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.1.1.1. Objetivos

- Determinar presencia de apomixis mediante clareo de sacos embrionarios en ecotipos de mora de castilla.
- Estimar la viabilidad del polen en ecotipos de mora de castilla.
- Evaluar métodos de escarificación en semillas de mora de castilla.
- Estimar variabilidad genética en progenies de materiales seleccionados de mora de castilla usando marcadores RAMs.

2.1.1.2. Marco Referencial

La mora de castilla *Rubus glaucus* Benth, es una fruta socialmente importante porque muchos agricultores dependen económicamente de su cultivo. Tiene buena aceptación en el mercado para el consumo en fresco y procesado. Se considera una especie en proceso de domesticación porque las casi 11,000 hectáreas cultivadas en Colombia han sido originadas mediante la selección de plantas silvestres. Existen en el país diferentes ecotipos de mora de castilla conocidos por los agricultores de acuerdo a las características del fruto, productividad, resistencia a factores bióticos y abióticos y la presencia o ausencia de acúleos (llamados comúnmente espinas). Entre los ecotipos se encuentra la Mora Hartona caracterizada por tener frutos grandes y ciclo corto; Mora Ranchona caracterizada por tener frutos pequeños, alta producción y ser estacionaria, Castilla Juntas caracterizada por tener alta producción, plantas y frutos medianos. Salenmora o mora sin espinas, es actualmente el más sembrado en Colombia y tiene alta producción y frutos medianos a grandes.

A pesar de ser un cultivo importante las investigaciones realizadas sobre su biología floral y modo de reproducción han sido limitadas. Se han hecho descripciones de la flor, el fruto y de los polinizadores pero no se ha profundizado en los mecanismos de reproducción. Estudios de los mecanismos de reproducción en el género *Rubus* han dado a conocer la apomixis como un proceso en el cual

[3] Diego Fernando Marmolejo Cortes

se producen embriones maternos sin la fertilización. La apomixis ha sido reportada en moras europeas, asiáticas y americanas. Una de las actividades agronómicas más importantes en el cultivo de la mora es la propagación, se utilizan comúnmente métodos vegetativos como acodos terrestres, acodos aéreos, esquejes, microesquejes; los esquejes o estacas son los más comunes porque es sencillo de aplicar y económico, pero es un medio de diseminación de antracnosis (*Colletotrichum sp*.), una enfermedad muy limitante del cultivo. La propagación por semilla ha sido poco utilizada por agricultores porque las semillas de mora tienen dormancia, están encerradas en un endocarpio duro esclerenquimatoso que restringe la germinación (Sugae, 2007).

En los últimos años especialmente en el departamento de Antioquia, Colombia, se está propagando cultivos comerciales a través de semilla. Los agricultores que están propagando mora por semilla aseguran que las plantas hijas tienen crecimiento uniforme y conservan las características deseables de las plantas madres. La propagación por semilla puede proporcionar más plantas que los otros métodos de propagación debido al número de semillas que tiene un fruto y el número de frutos que produce una planta, además puede ser un método apropiado para prevenir enfermedades, y de conservar el genotipo ex situ. Dada la importancia que tiene la mora de castilla para los agricultores de la región Andina y el desconocimiento que se tiene sobre esta especie se hace necesario realizar estudios básicos para determinar el comportamiento reproductivo para desarrollar futuros programas de mejoramiento genético.

2.1.1.3. Metodología

El estudio se realizó con ocho ecotipos de la colección de materiales de mora de castilla (*Rubus glaucus*) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, localizada en el corregimiento de Tenerife municipio del Cerrito Departamento Valle del Cauca. Los análisis de laboratorio se realizaron el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. De los ecotipos usados siete tienen acúleos (Ranchona Juntas, Castilla Juntas, Sara, Abrazos, Guatica, Trujillo espinas, San Antonio) y uno sin acúleos (Salenmora).

Metodología para determinar presencia de apomixis mediante clareo de sacos embrionarios en ecotipos de mora de castilla.

a. Colecta de flores

Se colectaron flores antes de la polinización en horas de la mañana y se colocaron en viales que contenían la solución fijadora FAA (Formaldehido: Ácido acético glacial: etanol absoluto: agua destilada en proporción 3:3:4, v/v), las flores se dejaron en la solución durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron en etanol al 70% a 4ºC.

b. Extracción de ovarios

De cada ecotipo se extrajeron ovarios individualmente con ayuda de un estereoscopio y almacenados en viales con etanol al 70% hasta proceder al clareo (Figura 1).

Figura 1. Pistilos de mora de castilla.

c. Deshidratación y clareo de ovarios

Se siguió la metodología descrita por Young *et al.,* (1979) donde se usa salicilato de metilo con modificaciones.

d. Visualización y análisis de ovarios

Los ovarios clareados se montaron sobre salicilato de metilo al 100% y se observaron en un microscopio de contraste de interferencia, se clasificaron como sexual, apomíctico, atrofiado, estéril y múltiple de acuerdo a la presencia o ausencia de las células de los sacos embrionarios. Se analizaron 80 ovarios por cada ecotipo. Los datos fueron sometidos a la prueba de ji-cuadrado para probar si la apomixis es independiente o dependiente de los ecotipos.

Metodología para estimar la viabilidad del polen en ecotipos de mora de mora de castilla.

a. Colecta de botones florales

De cada ecotipo se colectaron botones florales en horas de la mañana y se colocaron en viales que contenían etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1 v/v. Se dejaron en la solución 24 horas a temperatura ambiente y luego almacenada a 4ºC.

b. Tinción y análisis de botones florales

De cada ecotipo se extrajeron anteras con la ayuda de un estereoscopio y se montaron sobre un portaobjetos para macerarse y teñirse con carmín acético. Los granos de polen fueron clasificados de acuerdo a la tinción como viables (teñidos) e inviables (sin tinción).

c. Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza (ANDEVA), diseño completamente al azar donde cada botón floral fue una repetición y cada ecotipo un tratamiento. Para comparar la viabilidad en los ecotipos se usó la prueba de rango múltiple de Duncan.

Metodología para evaluar métodos de escarificación en semillas de mora de castilla.

Se cosecharon frutos maduros de plantas que se dejaron a libre polinización, de ecotipos provenientes del banco de germoplasma (Figura 2).

Figura 2. Frutos maduros de mora de castilla

Los frutos colectados se partieron, se extrajeron las semillas y el jugo manualmente, esta mezcla se almacenó en frascos de vidrio con agua para facilitar el proceso de fermentación (Figura 3). Después de ocho días de fermentación las semillas se pasaron por un colador de malla fina y se removieron mecánicamente bajo una corriente de agua (Figura 4). Luego las semillas se secaron sobre cajas plásticas a temperatura ambiente durante 8 horas aproximadamente. Se realizaron dos ensayos para evaluar métodos de escarificación.

Figura 3. Fermentación de semillas de mora

Figura 4. Lavado de semilla en malla fina bajo corriente de agua

Ensayo uno.

En el primer ensayo se evaluaron cuatro tratamientos de escarificación en cuatro ecotipos de mora de castilla. (Tabla 1)

Tabla 1. Descripción de los tratamientos

TRATAMIENTO	**Tiempo de inmersión**
Ácido sulfúrico 20%	30 minutos
Ácido ascórbico 500ppm	24 horas
Ácido cítrico 50ppm	72 horas
Agua	5 minutos

Ensayo dos

En el segundo ensayo se evaluaron seis tratamientos de escarificación en cinco ecotipos de mora de castilla (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de los tratamientos de escarificación realizados a los ecotipos en el ensayo dos

Tratamiento	Tiempo de inmersión
Ácido Sulfúrico 60%	5 minutos
Acido Sulfúrico 60%	15 minutos
Ácido Sulfúrico 60%	25 minutos
Ácido Cítrico	24 horas
Choque térmico	5 minutos caliente/frio
Agua	5 minutos

Siembra de semillas

Las semillas se sembraron en bandejas de germinación de 128 alvéolos con turba previamente desinfectada (Figura 5). Se hizo monitoreo diario para calcular los porcentajes y tiempos de emergencia.

Figura 5. Emergencia de semillas

Análisis de datos

Para evaluar los tratamientos de escarificación sobre los ecotipos en los dos ensayos se usó un diseño completamente al azar y para comparar los tratamientos y los ecotipos se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

Metodología para la extracción de ADN de plantas madre e hijas

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta *et al.*, 1983 modificado por Palacio, 2003. Aunque las cantidades de ADN fueron altas hubo problemas con la amplificación vía PCR debido a la presencia de compuestos fenólicos en el ADN, para lo cual se realizó la purificación del ADN usando un protocolo con Fenol- Cloroformo. En la extracción de ADN de plántulas se utilizó el

kit DNeasy Plant Mini kit de QUIAGEN. En la Figura 6 se observan los patrones de ADN obtenidos con los tres métodos.

Los ADN totales fueron visualizados en geles de agarosa 0.8% y teñidos con bromuro de etidio. Para determinar la concentración de ADN se realizó una curva de dilución con ADN del bacteriófago Lambda de Concentración inicial 30 ng/µl y llevado a una concentración final de 10, 45, 60 y 100 ng/µl. El ADN cuantificado se diluyó en agua tipo HPLC hasta 5 y 10 ng/ µl y se almacenó a –20 ºC.

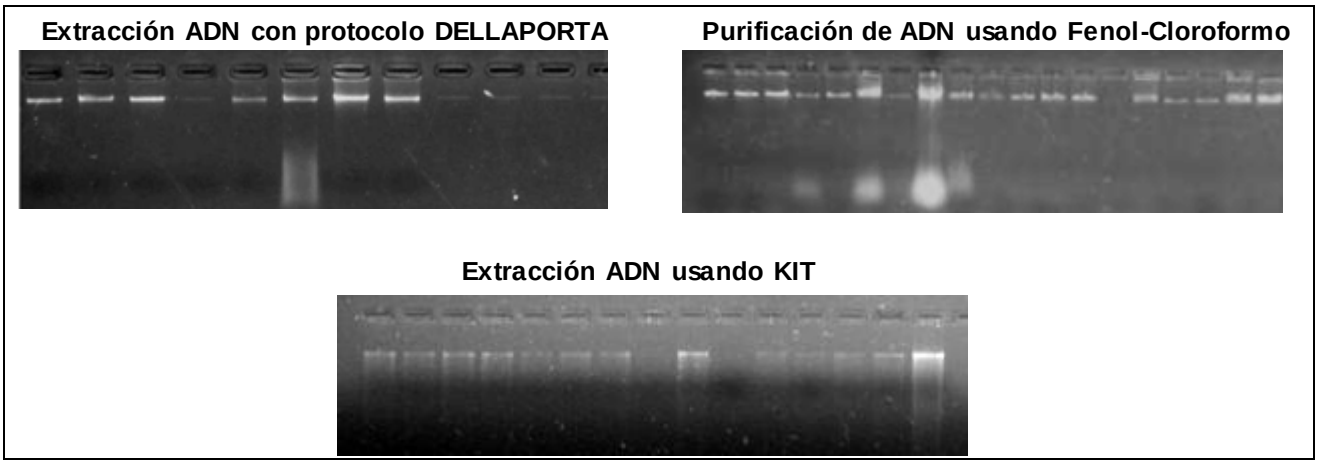


Figura 6. Calidad de ADN extraído con: protocolo, fenol-cloroformo y kit

Amplificación de ADN vía PCR RAMs

Para la amplificación vía PCR RAMs se evaluaron 4 cebadores (Tabla 3); se preparó un cóctel con un volumen final de 25 µl. Buffer 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq Polimerasa 1 U/ µl, cebador 2 µM y ADN 5ng/ µl.

Tabla 3. Cebadores RAMs

CEBADOR	SECUENCIA (5' a 3')
CA	DBD A $(CA)_7$
AG	HBH $(AG)_7$ A
TG	HVH $(TG)_7$ T
CCA	DDB $(CCA)_5$

Designaciones usadas para los sitios degenerados: H (A, T o C); B (G, T o C); V (G, A o C) Y D (G, A o T). La amplificación se realizó en un termociclador Bio Rab PTC-100 Programable Termal Controller de MJ Research, Inc®, usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 ºC por 5 minutos, seguido de 37 ciclos de 95 ºC por 30 segundos; la temperatura de hibridación varió para cada cebador así: 50 ºC cebador (AG -CA), 55 ºC cebador (TG) y 58 ºC cebador (CCA) por 45 segundos; extensión inicial de 72 ºC por 2 minutos y final de 72 ºC por 7 minutos.

Visualización de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 y 2% y visualizados bajo luz ultravioleta. La longitud de los productos de amplificación fue estimada por comparación con un marcador de peso molecular de 100pb de (Promega®). Para observar las bandas se utilizaron geles de poliacrilamida al 7%, corridos en buffer TBE 0.5X (Tris-borato EDTA, 0045M; EDTA, 0.001M) y N, N, N, N tetra metileno diamina (TMED) y persulfato de amonio 10%, teñidos con bromuro de etidio (Figura 7).

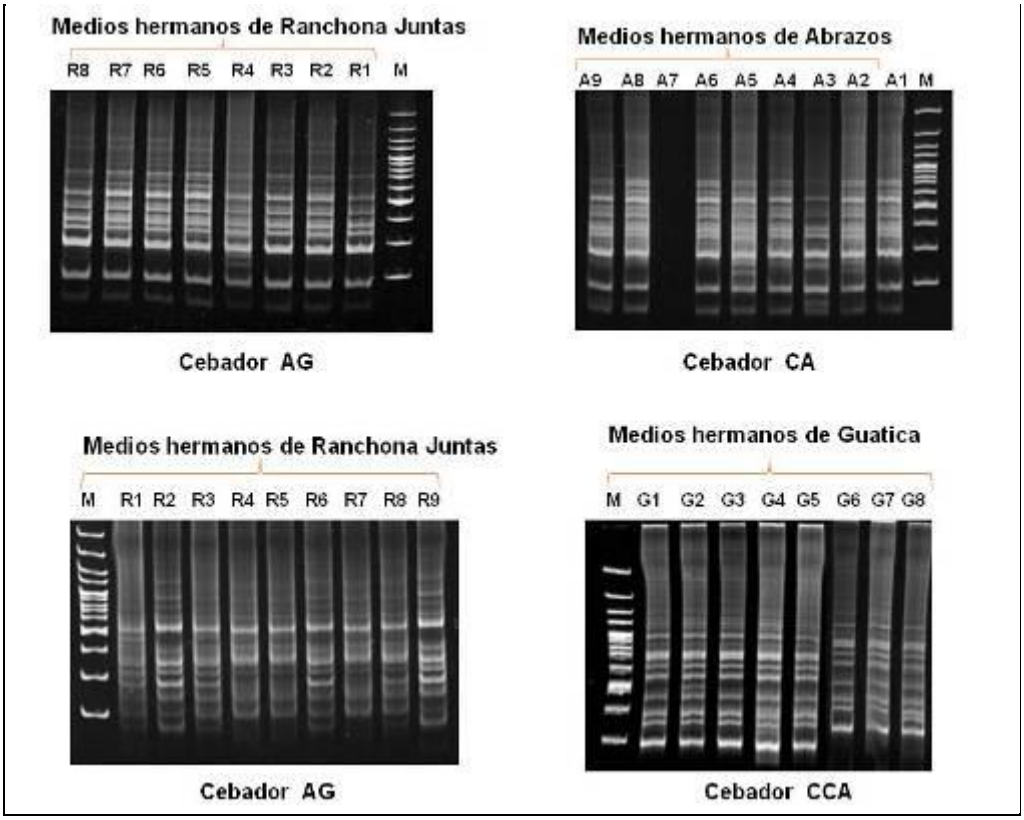


Figura 7. Patrones de bandas obtenidos con cada cebador

Análisis de los datos moleculares

Con los patrones de bandas de ADN obtenidos de los medios hermanos se generó una matriz binaria de ausencia (cero) y presencia (uno). Las estimaciones de similitud fueron calculadas con el método de Nei y Li (1979). Se realizó un análisis clúster por el método UPGMA y generó un dendograma utilizando el paquete estadístico NTSYS-pc versión 2.0.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas, heterocigocidad, loci polimórfico se utilizó el paquete estadístico TFPGA versión 1.3.

2.1.1.4. Resultados y Discusión

a. Evaluación de apomixis en ocho ecotipos de mora de castilla

La presencia de apomixis fue encontrada en ocho ecotipos de mora de castilla pertenecientes a la colección de materiales de mora de castilla de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. El saco embrionario del tipo Polygonum (ocho núcleos) fue encontrado en la mayoría de los ovarios evaluados en todos los ecotipos y el de tipo Oenothera (4 núcleos) también fue encontrado pero en menor proporción (Figuras 8 y 9). De las rutas de apomixis en la mora de castilla se encontró la gametofítica donde la formación del embrión se lleva a cabo a partir de la ovocélula por partenogénesis sin que ocurra la unión del gameto masculino con el femenino. De los dos tipos de apomixis gametofítica se pudo verificar la aposporia en la cual el saco embrionario se forma a partir de la nucela. Sacos múltiples o facultativos, característicos de las moras apomícticas se encontraron en 6 ecotipos (Mora sin espinas, Trujillo Espinas, Ranchona Juntas, Abrazos, Sara y Guatica) (Tabla 4).

La prueba de chi-cuadrado demostró que la apomixis es dependiente de los ecotipos es decir que se encuentra en todos pero en diferentes proporciones. El ecotipo guatica es el más apomíctico, el 37.5% de los ovarios son apomícticos y el ecotipo menos apomíctico es Ranchona juntas con 83,75% de los ovarios sexuales. En general todos los ecotipos son facultativamente apomícticos primando la sexualidad.

Tabla 4. Análisis del saco embrionario de ocho ecotipos de mora de castilla

	Porcentaje de sacos Embrionarios (n=80 ovarios)				
Ecotipo	**Sexual**	**Apospórico**	**estéril**	**atrofiado**	**Facultativo**
Mora sin espinas	73,75	13,75	6,25	0,0	6,25
Castilla Juntas	78,75	11,25	7,50	2,50	0,0
Trujillo espinas	88,75	3,75	1,25	1,25	5,00
San Antonio	67,5	25,0	3,75	3,75	0,00
Ranchona Juntas	83,75	11,25	1,25	1,25	2,50
Guatica	46,25	37,5	0,0	1,25	15,0
Sara	76,25	20,0	0,0	0,0	3,75
Abrazos	53,40	33,3	0,0	0,0	13,3

Este es el primer reporte de apomixis en las moras de castilla Colombianas y deber ser tenido en cuenta para iniciar programas de mejoramiento genético ya que las ventajas que ofrece la apomixis facultativa son muchas. Se destacan la fijación inmediata de caracteres deseables en genotipos superiores, no se necesita control riguroso de la polinización y permite la clonación de híbridos superiores. Esto se traduce en reducción de costos de producción de cultivares, reducción mínima del aislamiento físico para conservar líneas homocigotas y para los agricultores principalmente de países en desarrollo permite sostener altos

rendimientos por tiempo indefinido, usando parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción debidas a la segregación.

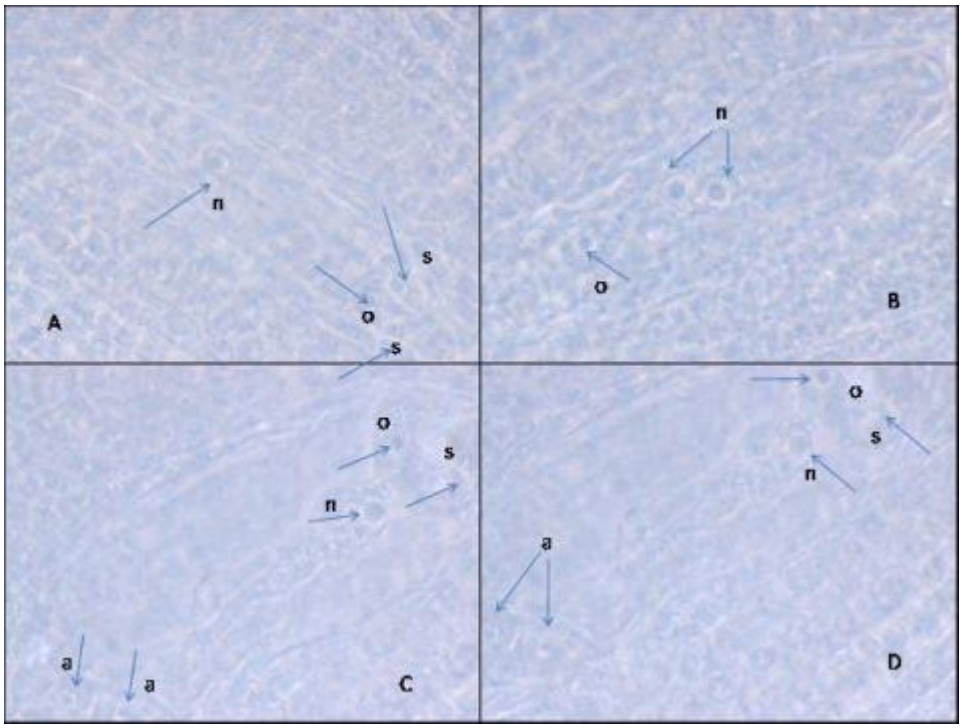


Figura 8. Sacos embrionarios de mora de castilla. A saco embrionario tipo onotera. B saco embrionario apospórico. C y D saco embrionario sexual. Designaciones usadas o: ovocélula, n: nucleo polar, s: sinergidas, a: antipodas

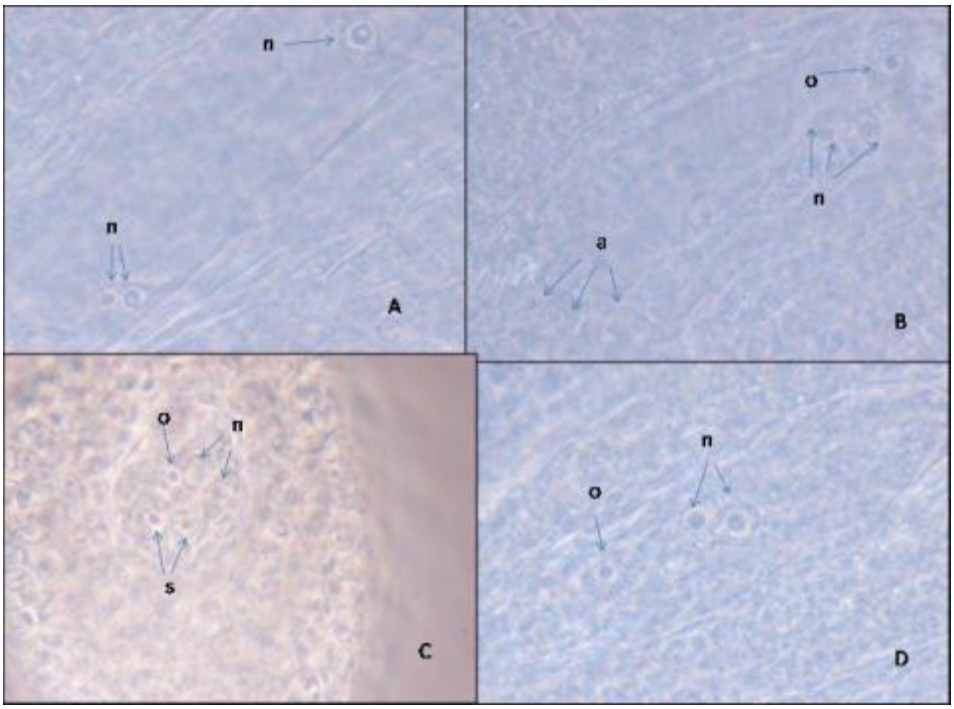


Figura 9. Sacos embrionarios de mora de castilla, A. múltiple. B saco con tres núcleos polares. C saco apospórico en formación. D. ovocélula y núcleos polares.

Para *Rubus glaucus* (tabla 4) hubo ecotipos con el 37% (Guatica) de apomixis y en todos apomixis facultativa, lo que ha sido demostrado en varias especies de moras. Einset (1951), en especies de mora con diferentes ploidias, encontró que todas las plantas parentales tuvieron una alta proporción de medios hermanos apomícticos producidos a través de pseudogamia en óvulos no reducidos, además encontró numerosos casos de partenogénesis en las especies tetraploides.

En este trabajo se encontraron sacos embrionarios apospóricos en los ocho ecotipos de mora evaluados lo que se ha demostrado en moras. Pratt y Einset (1955) encontraron sacos aposporicos; Prat *et al*., (1958) en *Rubus ideus* especie triploide encontraron sacos embrionarios apospóricos y reducidos, además demostraron la pseudogamia en polinizaciones experimentales. Asker y Jerling (1992) mencionan que los sacos múltiples son característicos en las especies apomícticas de mora, lo que pudo corroborarse en seis de los ocho ecotipos evaluados en este estudio (tabla 4).

En mora sin espinas, el ecotipo más cultivado en Colombia, se encontró 13,8% de apomixis y 6,25% de sacos facultativos lo que debe tenerse en cuenta si se piensa multiplicar semillas para sembrarlas comercialmente ya que la mayoría de las plántulas van a tener segregación, explicada por el 73.8% de sacos embrionarios sexuales. Esto se ha observado en los experimentos realizados en Ecuador por el INIAP, donde las semillas del ecotipo sin espinas muestran segregación. San Antonio un ecotipo muy cultivado por su alta producción, tiene 67,5% de sexualidad y 25% de apomixis lo que puede explicar la masiva multiplicación de semillas en Antioquia donde los agricultores afirman que las plántulas tienen un desarrollo uniforme y conservan las características de la planta madre.

b. Viabilidad del polen en ocho ecotipos de Mora de Castilla.

La tinción de los granos de polen con carmín acético permitió estimar la viabilidad del polen en los ocho ecotipos de mora de castilla. En total se contaron 87.969 granos viables y 11.866 inviables. Fue necesario transformar los porcentajes de viabilidad a arcoseno para cumplir con el primer postulado del análisis de varianza (ANDEVA) el cual requiere que los datos tengan una distribución normal y no binomial que ocurre cuando se trabaja con porcentajes. Con los datos transformados se realizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar para establecer si existían diferencias significativas entre la viabilidad de ecotipos (tabla 5).

Tabla 5. ANDEVA de viabilidad polínica de ocho ecotipos de mora

Fuente	GL	CM	F-Valor	Pr > F
Ecotipo	**7**	**0.16**	**4.85**	**0.0011 ***
Botón floral	**4**	**0.01**	**0.41**	**0.8026**
Error	**28**	**0.033**		
Total	**39**			

***diferencias significativas α=0.05**

Como hubo diferencias significativas entre ecotipos (tabla 5) se realizó una comparación de los promedios con la prueba de rango múltiple de Duncan. En la figura 10, se muestran los promedios transformados a arcoseno y se indican las diferencias significativas. Salenmora fue estadísticamente superior a los demás ecotipos: 1,45 de viabilidad polínica. Los ecotipos Ranchona Juntas y Trujillo espinas fueron superiores al ecotipo Castilla Juntas e iguales a Abrazos, San Antonio, Sara y Guatica.

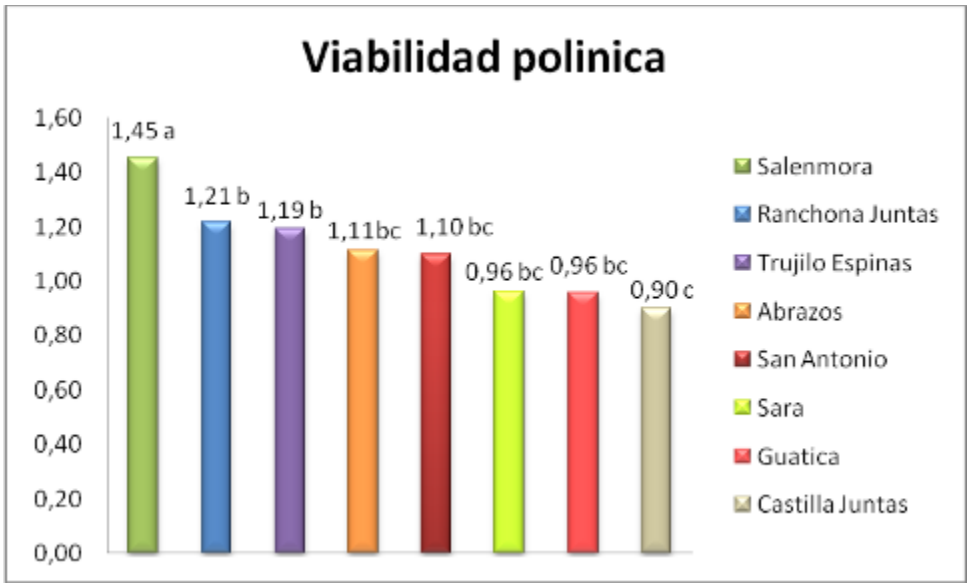


Figura 10. Viabilidad polínica en ocho ecotipos de Mora de Castilla. Promedios con la misma letra no difieren estadísticamente, α=0.05

Una de las razones de las diferencias en la viabilidad polínica entre ecotipos puede explicarse por la variabilidad genética, Nybom, (1985) menciona que la diversidad genética influye en los procesos anteriores a la formación del grano de polen entre y dentro de cada especie de mora y según la caracterización molecular hecha por Morillo *et al., (*2005) entre los ecotipos de mora evaluados hay variabilidad genética.

El polen fue colectado el mismo día y manipulado de igual forma para todos los ecotipos. Se hicieron observaciones de tétradas en todos los ecotipos, la prevalencia de tétradas normales confirmó la alta viabilidad (Figura 11). Los ecotipos que tuvieron las viabilidades más altas Salenmora, Ranchona Juntas, Trujillo Espinas y San Antonio (Figura 10), usualmente tienen buenas producciones. Aunque no se hizo una correlación entre el número de frutos producidos y la viabilidad polínica, las producciones observadas y las investigaciones hechas en otras moras permiten suponer que en la mora de castilla la calidad del polen influye en la producción de frutos.

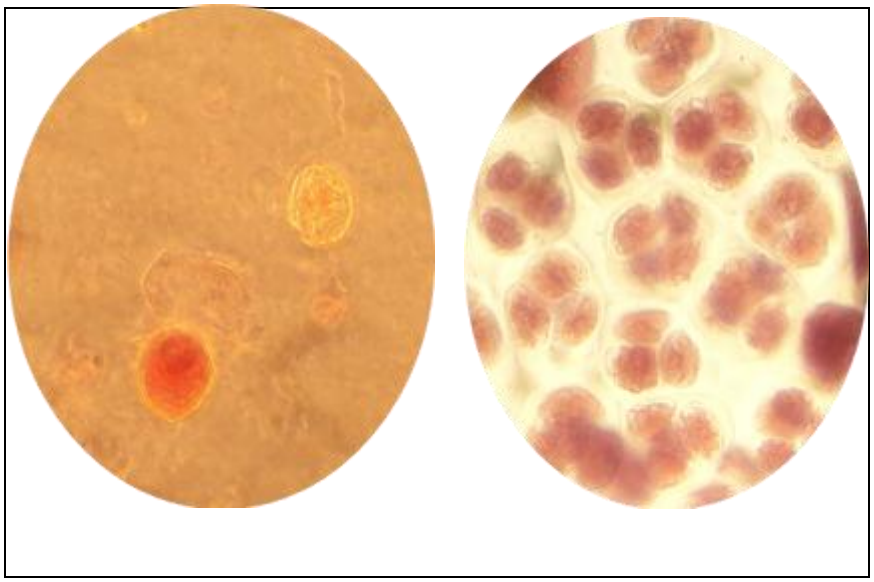


Figura 11. A Grano de polen viable (teñido) e inviable (transparente). B tétradas normales

La frecuencia de viabilidad polínica en los ecotipos de mora fue alta del 80 al 99% (tabla 6), contrastando con la mayoría de las moras en donde la viabilidad es usualmente baja. Gustaffson (1943) reportó baja viabilidad en moras suecas tiñendo granos de polen con azul de algodón. En especies triploides reportó 8% de viabilidad y en tetraploides 54% de viabilidad en contraste con diploides que tuvieron 81% de viabilidad.

Tabla 6. Frecuencia de viabilidad polínica en ocho ecotipos de mora de castilla

Ecotipo	granos viables	granos inviables	Viabilidad del polen (%)
Salenmora	10438	89	99.15
Trujillo Espinas	10627	703	93.8
Ranchona Juntas	11776	872	93.1
Sara	14126	3110	81.96
San Antonio	13657	2019	87.12
Guatica	10627	2154	83.15
Castilla Juntas	7313	1799	80.26
Abrazos	9640	1148	89.36

En este trabajo se embolsaron botones de todos los ecotipos (Figura 12) para evaluar autoincompatibilidad; la tendencia fue la limitada formación de frutos y semillas comparada con la libre polinización. En Salenmora, San Antonio y Guatica se produjo buen tamaño y cantidad de frutos en flores embolsadas.

Figura 12.Desarrollo de frutos proveniente de flores embolsadas y a libre polinización. A y B frutos de Salenmora, C y D frutos de Trujillo espinas.

c. Evaluación de métodos de escarificación en semillas mora de castilla

Se realizaron dos ensayos para evaluar diferentes tratamientos de escarificación en ecotipos de mora de castilla. En los dos ensayos llevados a cabo, la emergencia comenzó a los 60 días después de la siembra. Con ácido sulfúrico se registró los porcentajes más altos de emergencia 82% a los 106 días después de la siembra. Los ecotipos respondieron de manera diferenciada a los tratamientos (Tabla 7y 8). La propagación por semilla puede proporcionar más plantas que los otros métodos de propagación debido al número de semillas que tiene un fruto y el número de frutos que produce una planta, además puede ser un método apropiado para prevenir enfermedades trasmisibles por métodos de propagación vegetativa (i.e la perla del suelo).

Ensayo 1.

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos de escarificación usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Se encontraron diferencias significativas entre ecotipos. Los ecotipos con acúleos Ranchona Juntas y Trujillo Espinas tuvieron los porcentajes de emergencia más altos con 30 y 28% respectivamente y el ecotipo UNPM44 colectado en Ginebra tuvo el porcentaje de emergencia más bajo 3.6%. (Tabla 7).

Tabla 7. Promedios de emergencia de los tratamientos sobre los ecotipos

TRATAMIENTO	TRUJILO ESPINAS	TRUJILO SIN ESPINAS	UNPM12	UNPM44	Promedio
Acido sulfúrico 20%	36,5	27,1	54,2	2	29,97
Acido ascórbico 500ppm	22,9	8,3	36,2	4,2	17,9
Ácido cítrico 50ppm	27	14,6	14,6	2	14,55
Agua	29,2	24	16,7	6,3	19,05
Promedio	28,92	18,5*	30,42	3,62*	

Diferencias significativas entre promedios*, α=0,05

Para Ranchona Juntas a los 97 días se registró 36.5% de emergencia y a los 118 días 54% con el tratamiento 1; para el ecotipo Trujillo Espinas con el tratamiento 1, se observó 36% a los 118 días en contraste con UNPM45 que en el mismo período de tiempo germinó sólo el 2.03 %, con el mismo tratamiento (Figura 13).Se realizó seguimiento a las hijas al ecotipo Trujillo sin espinas para observan la segregación. Hubo segregación en el ecotipo sin acúleos, la mayoría de las hijas presentaron acúleos, se evidencia que el carácter acúleos no es estable porque hay plantas que tienen acúleos hasta el primer entrenudo del tallo y en otros casos los acúleos están dispersos o sobre los foliolos.

Ensayo 2

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos; el tratamiento ácido sulfúrico al 60% tuvo el promedio de emergencia más alto 52.2% y con los ecotipos Salenmora 1 y Sara se registraron emergencias del 82,3 y 80,2% También se encontraron diferencias significativas entre ecotipos, Castilla Juntas, Sara, Guatica y Salenmora registraron mejores emergencias que Tenerife (tabla 8). Salenmora no fue constante en la germinación, cuando se evaluaron tres plantas de este ecotipo hubo diferencias significativas entre ellas seguramente debido a las diferencias genéticas entre ellas explicadas por el 73% de ovarios sexuales y la viabilidad Polínica del 99%.

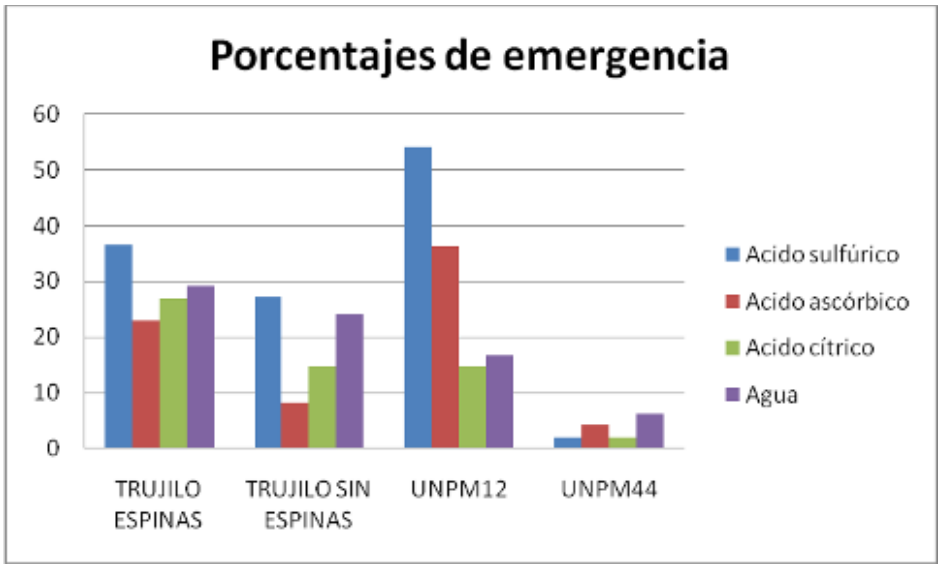


Figura 13. Porcentajes de emergencia de ecotipos de mora de castilla bajo 4 tratamientos de escarificación

Tabla 8. Promedios de emergencia de seis tratamientos de escarificación en ecotipos de mora de castilla

Tratamiento	Salen mora1	Castilla Juntas	Tenerife	Salen mora7	Guatica	Sara	Salen mora 6	Promedio Trata
Acido sulfurico 60%	82,3	62,5	20,8	35,4	57,3	80,2	27,1	**52.229 A**
Choque térmico	22,9	51,0	13,5	27,1	47,9	51,0	41,7	**37.643 AB**
Acido citrico 50ppm	22,9	61,5	33,3	33,3	20,8	37,5	38,5	**38.771 AB**
Acido sulfurico 30%	14,6	52,1	24,0	39,6	35,4	42,7	49,0	**36.443 AB**
Acido sulfurico 20%	13,5	40,9	25,0	22,9	60,4	60,4	34,4	**35.400 B**
agua	1,0	56,3	20,8	34,4	22,9	29,2	57,3	**31.700 B**
Promedio Ecotipo	**26.200 C**	**55.050 A**	**22.900 C**	**32.117 BC**	**40.783 AB**	**50.167 A**	**41.333 A**	

Tratamientos y ecotipos con diferente letra difieren estadísticamente, α=0,05

Desde el inicio de la emergencia a los 60 días hasta los 90 días se registró poca emergencia; pasados 90 días y hasta los 106 días se pasó de promedios del 10 al 55%. Figura 14.

En este trabajo se registraron emergencias del 82% a los 3,5 meses después de la siembra escarificando con ácido sulfúrico (tabla 8). Los ecotipos respondieron de manera diferenciada a los tratamientos. Castilla Juntas, Sara, Guatica y Salenmora tuvieron emergencias más altas que Tenerife. Salenmora no fue constante en la emergencia porque se evaluaron tres plantas de este ecotipo y hubo diferencias significativas entre ellas. Sugae, (2007) registró diferencias significativas entre especies.

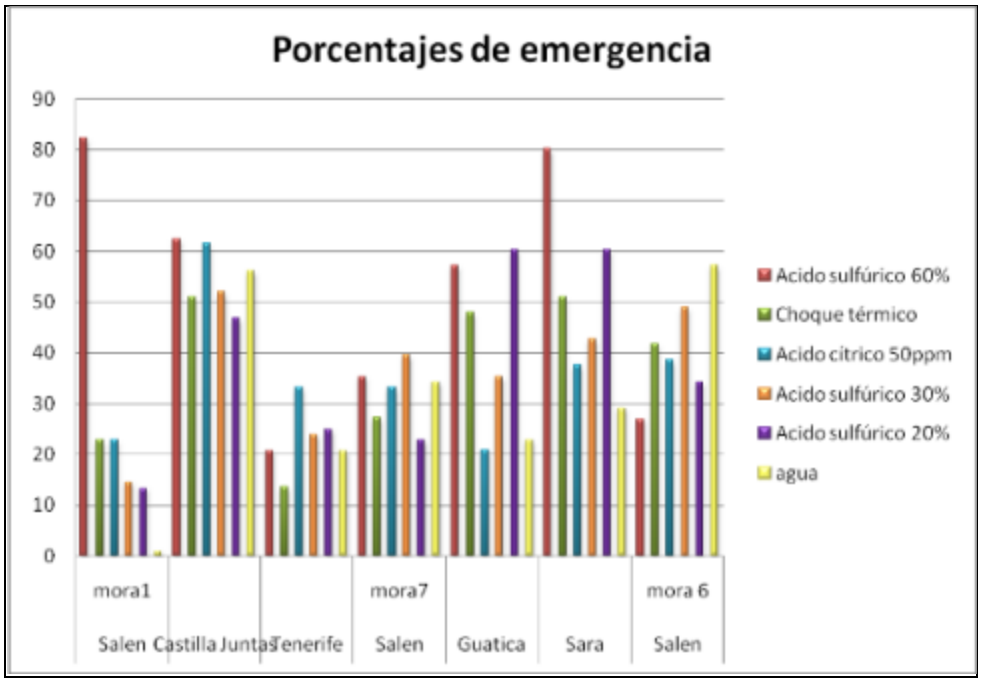


Figura 14. Promedios de emergencia en ecotipos de mora de castilla bajo tratamientos de escarificación.

El choque térmico y el ácido cítrico son tratamientos que deben tenerse en cuenta porque registraron emergencias de 61 y 51%, respectivamente. Además son tratamientos sencillos de aplicar y no requieren mayores cuidados por parte de los agricultores. El ácido cítrico puede obtenerse en las fincas a partir de limones que tienen altas concentraciones de ácido cítrico. Aunque el ácido sulfúrico es el tratamiento más eficiente no es sencillo de aplicar dados los costos y restricciones que tiene la comercialización, además de los cuidados que deben tenerse para su manipulación que difícilmente pueden tenerse en condiciones de campo. Su aplicación se puede realizar para investigación en programas de mejoramiento genético.

d. Variabilidad genética en medias hermanas de seis ecotipos de mora de castilla.

Usando 4 cebadores RAMs se estimó la variabilidad genética en cinco progenies de medios hermanos de los ocho ecotipos evaluados de mora de castilla. En todos los ecotipos se encontró variabilidad genética y se detectaron duplicados. Algunos parámetros genéticos como porcentaje de loci polimórfico y heterocigocidad fueron estimados usando el programa TFPGA (herramientas para el análisis genético de poblaciones). El número de loci evaluado estuvo entre 57 y 49 significativos si se tiene en cuenta que se generaron de 4 cebadores RAMs y el número de loci polimórfico fue bajo entre 16 y 34 %. La heterocigocidad fue baja y estuvo entre 0.10 y 0.25.

La polinización de la mora es predominantemente cruzada y es facilitada por la diferenciación temporal de los sexos donde el polen esta receptivo antes que los

ovarios, lo que puede explicar la variabilidad genética encontrada en los medios hermanos. Con el paquete estadístico NTSYS se construyeron dendogramas de cada ecotipo para observar agrupamientos genéticos de los medios hermanos.

Tabla 9. Parámetros genéticos

Material	Heterocigocidad insesgada	% loci polimórfico
Ranchona Juntas	0.15	38.9
Abrazos	0.10	32.6
Castilla Juntas	0.13	35.3
Trujillo espinas	0.22	54
Guatica	0.25	57.9

e. Agrupamientos genéticos de los medios hermanos

Ecotipo Ranchona Juntas

El análisis mediante el coeficiente de Nei li (1979) a un índice de similaridad de 0.94 diferenció los medios hermanos en 6 grupos, un grupo grande con 6 duplicados y dos grupos con tres duplicados cada uno (Figura 15).

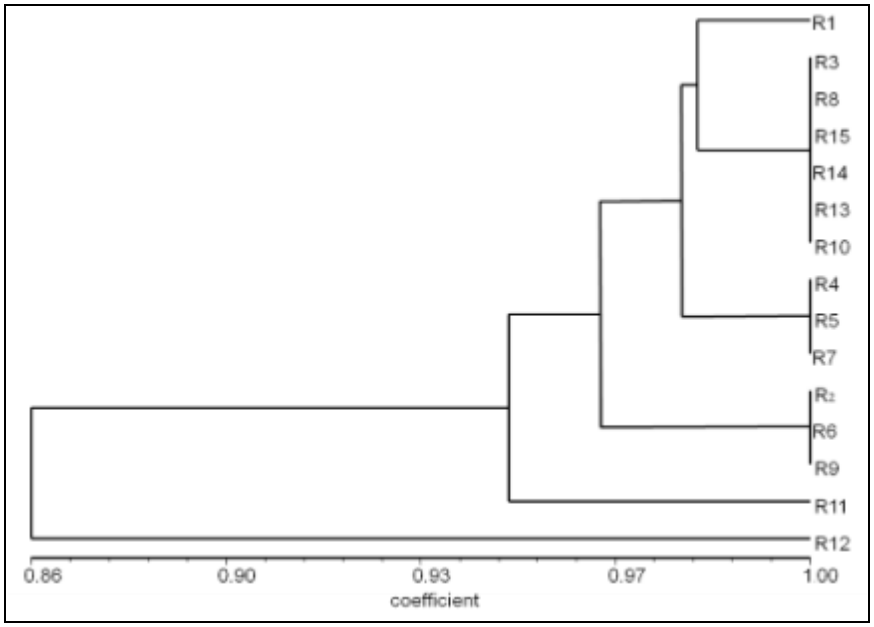


Figura 15. Árbol de la estructura genética de medios hermanos de Ranchona juntas basado en el coeficiente de similaridad de Nei-li, calculado de 4 cebadores RAMs.

Ecotipo abrazos

A un índice de similaridad de 0.97 se formaron dos grupos grandes, un grupo con dos subgrupos y cuatro duplicados y en el otro grupo dos subgrupos y dos duplicados.

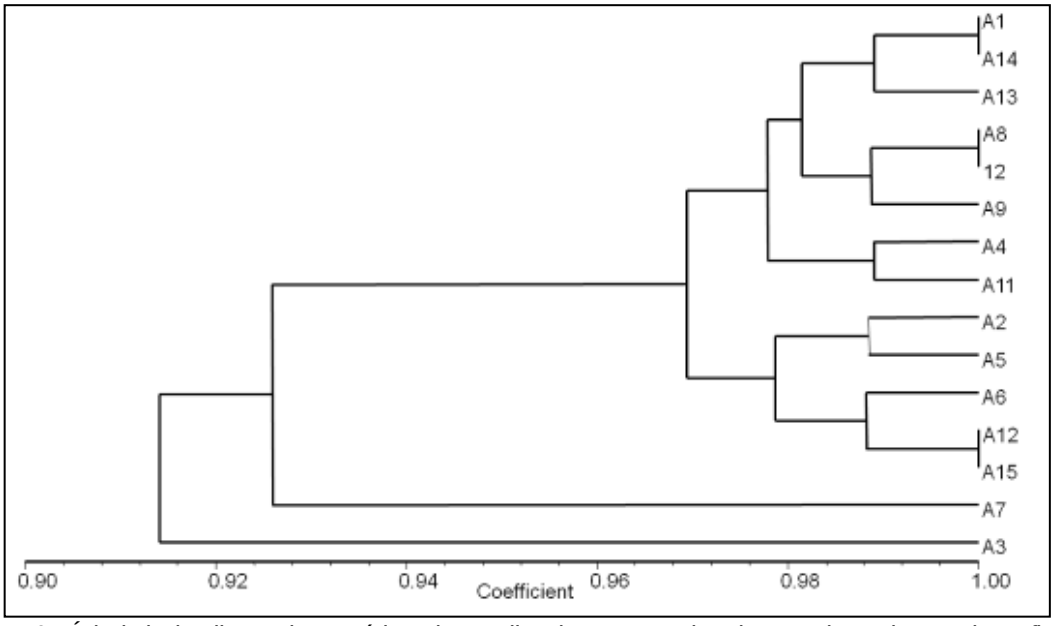


Figura 16. Árbol de la distancia genética de medios hermanos de Abrazos basado en el coeficiente de similiaridad de Nei-Li, calculado de 4 cebadores RAMs.

Ecotipo Castilla Juntas

A un índice de similaridad de 0.94 se formaron 3 grupos un grupo grande con 5 subgrupos y tres duplicados un grupo con dos individuos y el otro con un individuo sin duplicados.

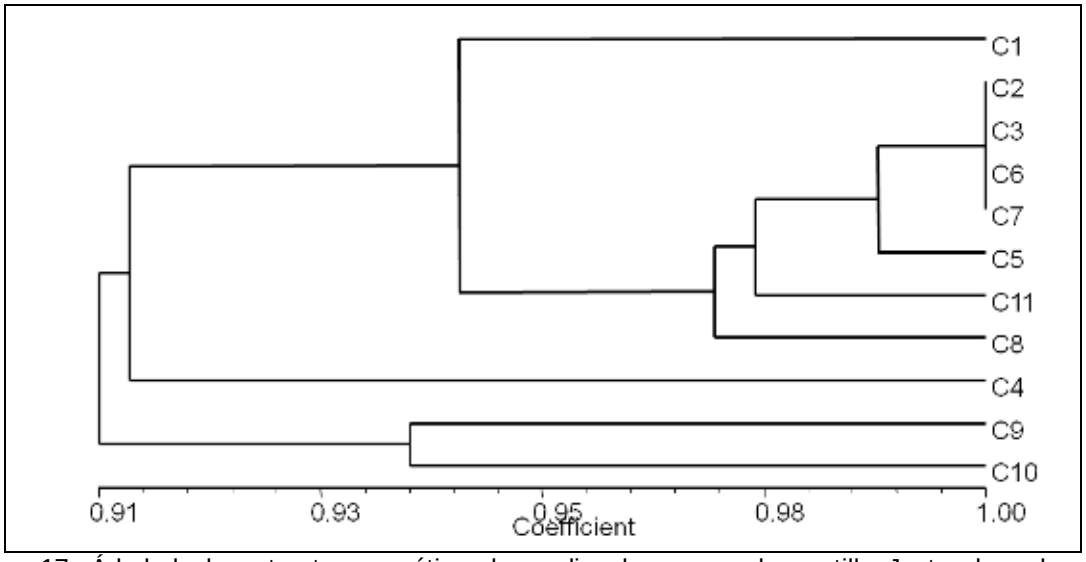


Figura 17. Árbol de la estructura genética de medios hermanos de castilla Juntas basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de 4 cebadores RAMs.

Ecotipo Guatica: A un índice de similaridad de 0.87 se formaron tres grupos un gran grupo con 5 subgrupos y dos duplicados, un grupo con dos subgrupos y el otro con un individuo.

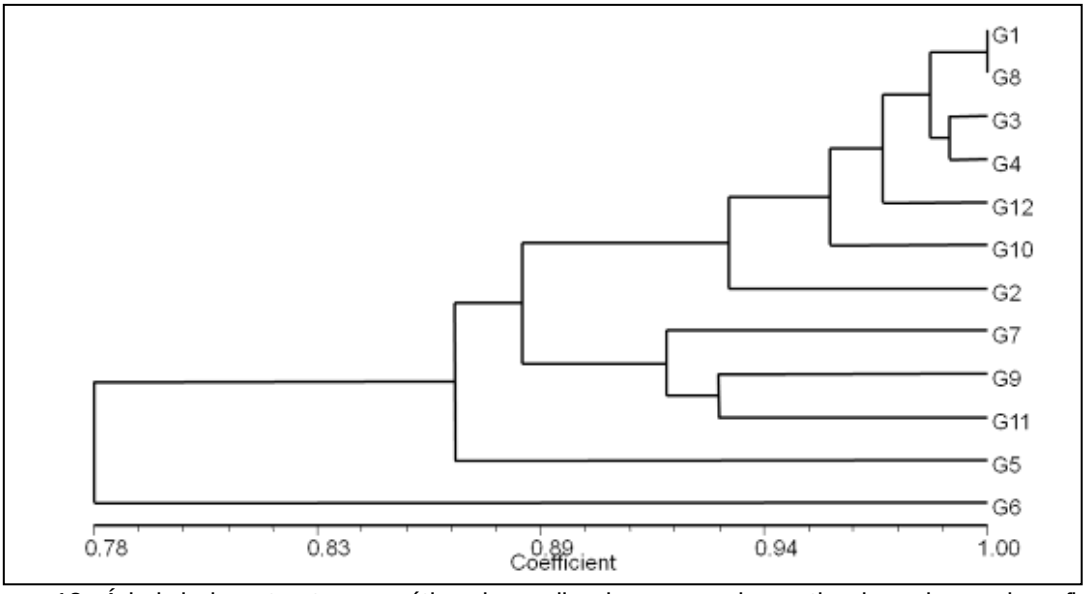


Figura 18. Árbol de la estructura genética de medios hermanos de guatica basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de 4 cebadores RAMs.

Ecotipo Trujillo sin espinas

A un índice de similaridad de 0.86 se formaron cinco grupos, cada grupo con subgrupos y un grupo grande con 2 duplicados.

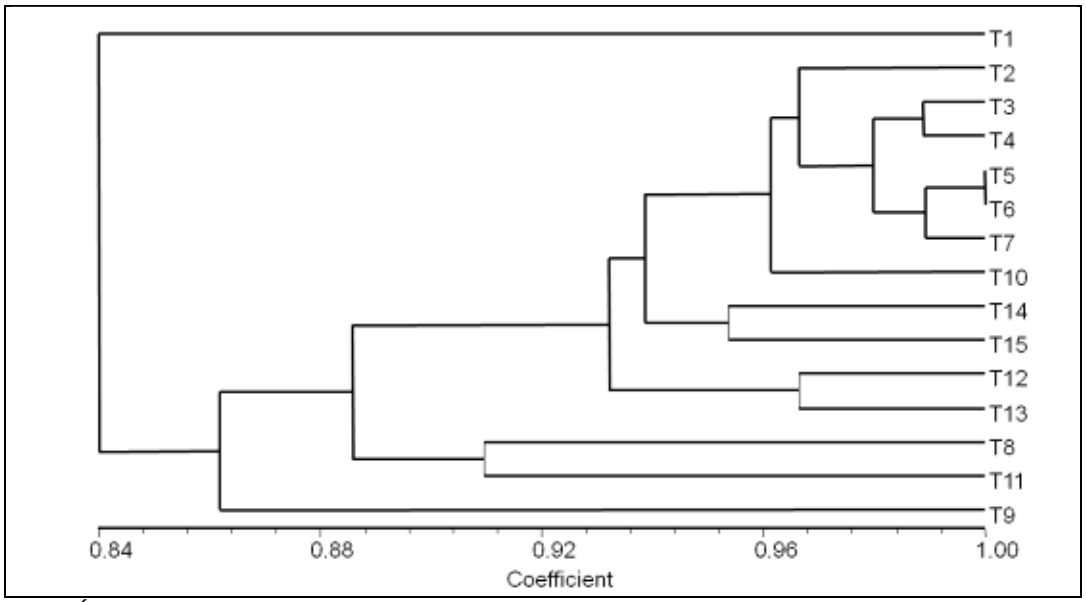


Figura 19.Árbol de la estructura genética de medios hermanos de Trujillo con espinas basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de 4 cebadores RAMs.

El análisis de agrupamiento evidenció la variabilidad encontrada en todos los ecotipos y la segregación existente en los medios hermanos. En todos los ecotipos

se encontraron duplicados y formación de grupos genéticos. Hay ecotipos con mayor variabilidad genética en las progenies de medios hermanos posiblemente al grado de heterocigocidad y al porcentaje de polinización cruzada que tenga cada ecotipo.

Los resultados de esta investigación concuerdan con las investigaciones realizadas para evaluar variabilidad genética en progenies de moras apomícticas usando marcadores dominantes. Marcadores dominantes como AFLPs y RAPDs han sido usados para estimar variabilidades en medios hermanos de especies de *Rubus* apomícticas. Amsellem *et al*., (2001) reportaron que con estos marcadores se pudo discriminar variabilidad y uniformidad genética en medios hermanos de individuos de *Rubus alceifolius*.

Estos resultados demuestran que las especies de mora apomícticas pseudogámicas, tienen baja variabilidad dentro y entre progenies aunque la reproducción sexual contribuye a la variabilidad genética en poblaciones naturales.

2.1.1.5. Conclusiones

- La presencia de apomixis facultativa fue encontrada en ocho ecotipos de mora de castilla pertenecientes a la colección de materiales de mora de castilla de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Predominó la sexualidad, ya que entre 30 y 83 % de los ovarios evaluados fueron sexuales.
- Se encontró alta viabilidad polínica entre el 80 y 99 % de los granos evaluados.
- La apomixis facultativa y la alta viabilidad polínica encontrada sugiere la presencia de speudogamia donde el polen es necesario para la producción de semillas y frutos.
- La baja variabilidad genética, loci polimórfico entre 16 y 34% y heterocigocidad entre 0.10-0.25, la formación de grupos genéticos y plántulas con el mismo genotipo concuerdan con los reportes hechos en moras apomícticas facultativas.
- La emergencia de semillas de mora bajo tratamientos de escarificación en promedio tardó 60 días y se registró emergencias hasta cinco meses después de la siembra.
- Los porcentajes de emergencia más altos del 80% se obtuvieron escarificando con ácido sulfúrico al 60%.
- Los tratamientos ácido cítrico y choque térmico registraron 61 y 51% de emergencia y deben tenerse en cuanta debido a su fácil manipulación en campo.
- De acuerdo a las variaciones encontradas en los porcentajes de emergencia; el ecotipo, sustrato, tratamiento de escarificación y ambiente influyen en la emergencia de las semillas de mora de castilla.

2.1.1.6. Bibliografía

AMSELLEM, L.; NOYER, J.; HOSSAERT, M. (2001) Evidence For A Switch In The Reproductive Biology Of *Rubus Alceifolius* (Rosaceae) Towards Apomixis, Between Its Native Range And Its Area Of Introduction. A.J of Bot 88(12): 2243–2251.

CRANE, M. (1943). Reproductive versatility in *Rubus.* I. Morphology and inheritance. *Joun of Gen* (40): 109–118.

GUSTAFSSON, A. (1943). The genesis of the European blackberry flora. *Lunds Univers Ars* (39):1–200.

KOLLMANN, J.; STEINGER, T.; BARBARA, R. (2000). Evidence of sexuality in European Rubus (Rosaceae) species based on AFLP and Allozyme analysis. *Ame Journ of Bot*. 87(11): 1592-1595.

WERLEMARK, G.; NYBOM, H. (2003).Pollen donor impact on progenies of pseudogamous blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*). *Euphytica* 133:71–80,

2.1.2. Reconocimiento y evaluación de enemigos naturales asociados a perla de la tierra *Eurhizoccocus colombianus* Jakubsky (1965) en tres zonas productoras de mora4

Objetivo del Proyecto (3):"*Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.1.2.1. Objetivos específicos

- Realizar el reconocimiento de especímenes de perla de la tierra y sus enemigos naturales
- Evaluar la patogenicidad de los enemigos naturales más promisorios en condiciones de laboratorio.

2.1.2.2. Marco Referencial

En Colombia, el manejo fitosanitario de la mora (*Rubus glaucus*) es considerado el mayor limitante de la producción. El primer estudio sobre insectos-plaga asociados al cultivo fue realizado por Choucair (1962), quien registró a la perla del suelo *Margarodes* sp., adherido a la raíz de la planta succionando savia. Figueroa (1965) citado por Martínez (1974) la encontró sobre arracacha, *Arracacia xanthorrhiza Bancr.*, en el Valle del Cauca y la identificó como *Eurhizococcus brasiliensis*. En el mismo año, Jakusky corroboró la identificación como *E. colombianus*. Martínez (1974), reportó la presencia de perla de la tierra asociada a mora en la localidad de Costa Rica (Ginebra, Valle del Cauca).

La especie *Eurhizococcus colombianus* se encuentra clasificada en el Orden: Heteroptera, Familia: Margarodidae, Tribu: Eurhizococcini (Jakubski, 1965). Especie que ha afectado la producción de mora en el Valle del Cauca durante los últimos 30 años. Los estadíos ninfales fijan su estilete en las raíces de las plantas

[4]Ana Milena Caicedo. Universidad Nacional de Colombia.

para extraer la savia, conllevando a su deterioro progresivo hasta causar la muerte de las mismas (Foldi, 2005). El control con el uso de insecticidas de síntesis no han sido efectivos por la presencia de la cera que recubre los estadíos ninfales adheridos a la raíz y la profundidad a la cual se encuentran, entre 10-30 cm de profundidad, factores que contribuyen a la ineficacia del manejo químico. Adicionalmente, las condiciones topográficas (pendientes) y climáticas (alta pluviosidad), favorecen la baja residualidad y penetrabilidad de los productos químicos (Zapata, 2009).

Tanto la hembra como los machos solo cumplen funciones de reproducción y no se alimentan. Las hembras suben a la superficie del suelo para aparearse y después vuelven a las raíces para ovipositar los huevos en un ovisaco. El desarrollo tanto de machos como hembras se caracteriza por estadíos ápodos, a excepción del primer estadío ninfal, el cual es circular, pequeño, 0.7-1.4 mm de largo y 0.2-0.6 mm de ancho y se le conoce como gateador o “crawler” (en inglés) (Foldi, 2005). Algunos autores como Osorio (2005), Carvajal (2002) y Lopera (2001), hacen referencia a este estadío como estado larval, lo cual está erróneamente designado, considerando que el estado larval se presenta en insectos holometábolos (metamorfosis completa) y la perla de la tierra es un insecto hemimetábolo (metamorfosis incompleta) el cual se desarrolla en huevos, ninfas, quistes y adultos (Foldi, 2005).

Como alternativa de control se presenta el desarrollo y evaluación de una propuesta de manejo integrado de *E. colombianus* en cultivos de mora en el Valle del Cauca, basada en el reconocimiento de la especie-plaga y los principales enemigos naturales y su posterior identificación, multiplicación y evaluación en campo. Diversos estudios con insecticidas químicos han sido evaluados para las diferentes especies de perla de tierra a nivel mundial. De Klerk (1987) evaluó el efecto del Hexaclorobutadieno incorporado al suelo para el control de adultos. González *et al* (1969) evaluó 37 insecticidas sobre todos los estadíos de perla *Margarodes vitis* en condiciones de laboratorio, ninguno produjo resultados satisfactorios. Productos como Dioxathion, Disulfuton, Phorate, Parathion y Carbophenothion, aunque no causaron mortalidad a los adultos, inhibieron la eclosión de los huevos. En Colombia, no se conoce ningún estudio sobre evaluación de insecticidas sobre *E. colombianus*.

2.1.2.3. Metodología

El reconocimiento de los estadíos biológicos y búsqueda de los enemigos naturales asociados a *E. colombianus*, se realizó en zonas productoras de mora del departamento del Valle del Cauca, municipio de Ginebra, corregimiento de Juntas, vereda Portugal y en la corregimiento Cocuyos, vereda la Cascada, Valle del Cauca, en fincas ubicadas a una altura promedio entre 2.100 y 2245 m.s.n.m. y temperatura promedio de 16 ±5°C y humedad relativa de 80 ±5 %. En el departamento de Risaralda se muestreó la zona de Santa Rosa de Cabal, vereda

La Paloma a 1800 m.s.n.m. y temperatura promedio de 17 °C y en el departamento de Caldas, en el programa de sistemas agropecuarios de la seccional Sena –Manizales a una altura promedio de 2.153 msnm y temperatura promedio de 18 ±5°C y HR de 80 ±5%.

Se realizaron salidas periódicas cada tres meses durante 18 meses. En cada una de las zonas seleccionadas se colectaron especímenes de los diferentes estadíos de perla de tierra y muestras de suelo en diez sitios diferentes, tres plantas por sitio y tres muestras de suelo por planta con barreno sacabocado a una profundidad entre 0-30 cm. Las muestras de especímenes se almacenaron en viales plásticos y el suelo en bolsas plásticas, rotuladas y transportadas en neveras de icopor al laboratorio de cría de insectos de la universidad Nacional sede Palmira, para su procesamiento e identificación.

Procesamiento muestras en laboratorio

Los especímenes colectados en campo se clasificaron de acuerdo a su estadío, huevos, ninfas (quistes) y adultos para su diagnóstico taxonómico. El resto de especímenes se sumergieron en una solución de hipoclorito al 3% durante 3 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se confinaron en vasos plásticos con arena estéril y los individuos que presentaban sintomatología de infección por hongos, se separaron en cámaras húmedas, para su aislamiento, purificación, multiplicación e identificación. Los especímenes sanos se sometieron a un proceso de cuarentena para su uso en bioensayos de laboratorio.

Las muestras de suelo de cada zona se mezclaron y se procesaron 10 sub-muestras de 300 g, con 10 larvas de *Diatraea saccharallis* como insecto-trampa durante siete días. Las larvas muertas y con cambios de color se lavaron y se colocaron en cámaras húmedas para la recuperación de hongos y trampas White para la recuperación de nematodos entomopatógenos. Una vez recuperados y debidamente aislados, purificados, identificados y almacenados, se multiplicaron masivamente bajo condiciones de laboratorio. A cada muestra de suelo se le realizó tres veces el mismo procedimiento.

Pruebas de patogenicidad

Se realizaron bioensayos para determinar la mortalidad de ninfas de segundo instar de *E. colombianus*. Se utilizó el método de inmersión y la unidad experimental consistió en un vaso plástico de 5 onzas con 3g de arena estéril y 3% humedad (v/v) y un solo individuo. Cada tratamiento contó con 10 unidades experimentales y tres repeticiones en el tiempo. Se evaluó una sola dosis, $1x10^{10}$ esporas/ml. El tratamiento control sólo se le aplicó agua estéril.

Se utilizó el diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones en el tiempo. El bloque, el criterio de bloque fue la repetición en el tiempo. La evaluación se realizó a los cinco y nueve días después de inoculados. Se registró el número

de insectos muertos, los cuales se pasaron a cámara húmeda para la esporulación del hongo. Los datos se sometieron a análisis de varianza y separación de medias por Tukey. Los tratamientos fueron los aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* y cepas comerciales de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana.*

2.1.2.4. Resultados y discusión

a) Reconocimiento de *E. colombianus*

Se obtuvieron especímenes de todos los estadíos biológicos de *E. colombianus*, huevos y ninfas de primer instar (Fig. 20); ninfas de segundo, tercero, prepupa y hembra adulta de *E. colombianus* (Fig. 21). Es importante resaltar que durante todo el tiempo de muestreo siempre se encontraron los diferentes estadíos, lo cual sugiere el traslape de generaciones, lo que permite la persistencia del insecto durante todo el ciclo del cultivo. Adicionalmente, se observó que las hembras adultas presentan una marcada diferencia de tamaños, encontrándose individuos con un tamaño de hasta 4 veces de diferencia (Fig. 22). Las especies de la familia Margaroridae tienen la capacidad de reproducirse por partenogénesis tipo telitoquia facultativa, permitiendo que las hembras produzcan huevos sin necesidad de cópula con el macho, siendo posible obtener hembras tanto de reproducción sexual como asexual (Fig. 23). Es importante resaltar el hallazgo de pupas y adultos machos de *E. colombianus*, lo cual no había registrado por ningún autor hasta la fecha (Fig. 24).

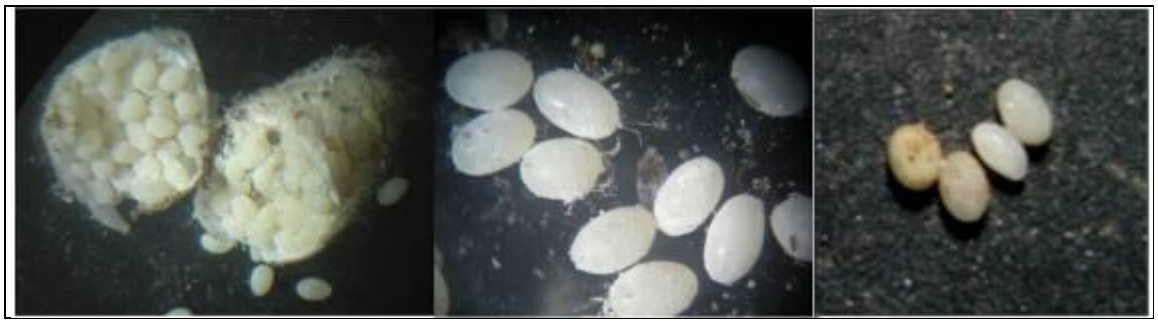


Figura 20. Huevos, Ninfas de primer instar de *E. colombianus*

Figura 21. Ninfas de segundo, tercer, cuarto instar. Prepupas y Hembra adulta de *E. colombianus*

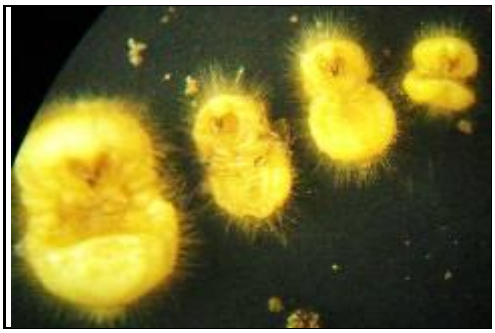


Figura 22. Hembras de diferente tamaño de *E. colombianus*

Figura 23. Hembras partenogenéticas y sexuales de *E. colombianus*

Figura 24 . Pupa y preimago de macho de *E. colombianus*

Reconocimiento de enemigos naturales

Se procesaron 154 muestras de suelo procedentes de cuatro sitios de tres departamentos diferentes. Todas las muestras fueron positivas para hongos entomopatógenos. Se capturaron adultos y ninfas de *E. colombianus* con presencia del hongo *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* de la vereda Portugal, municipio de Ginebra (Fig. 25). En Risaralda y Caldas se aislaron cuatro aislamientos de *M. anisopliae* y dos de *B. bassiana*. No fue posible recuperar nematodos entomopatógenos asociados a estadíos de *E. colombianus.*

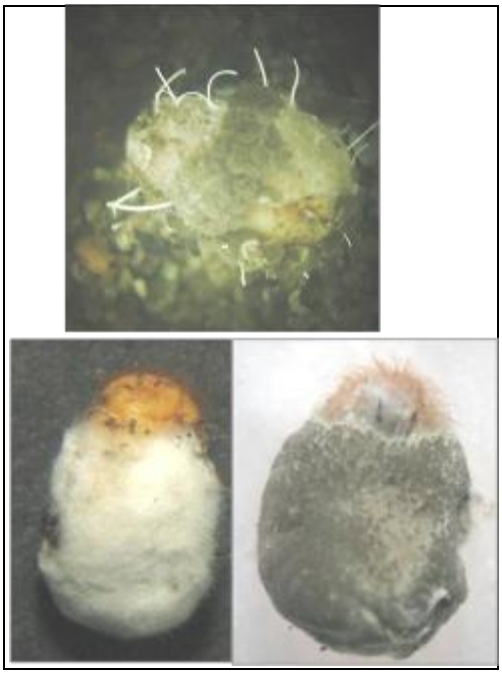


Figura 25. Desarrollo natural del hongo *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de *E. colombianus.*

Las cepas aisladas tanto de especímenes de *E. colombianus* como de perla de tierra como del insecto-trampa, fueron aisladas, purificadas y almacenadas en el laboratorio (Fig. 26).

Pruebas de patogenicidad:

El tratamiento que causó la mayor mortalidad a las ninfas de tercer estadío fue *M. anisopliae* aislado de Portugal, con 53% y 100% a los cinco y nueve días después de inoculados respectivamente. En contraste, *P. fumosoroseus* causó sólo el 6.6% a los cinco días y el 67 % a los nueve días. Los hongos comerciales evaluados de *M. anisopliae* y *B. bassiana* a los cinco días de inoculados causaron mortalidades entre 6 y 23 %, pero a los nueve días *M. anisopliae* alcanzó el 70% de mortalidad y *B. bassiana* llegó a sólo 36%.

Figura 26. Aislamiento y purificación de *Metarhizium* (A) y *Paecilomyces* (B) de estadios de perla de la tierra

Los resultados obtenidos son contrastantes con respecto a las evaluaciones realizadas por Carneiro *et al* (1994), encontraron que a una concentración entre 10^5 y 10^8 conidias/ml de *Paecilomyces fumosoroseus* causó una mortalidad del 94% en contraste con los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* con sólo un 30% de mortalidad, 28 días después de inoculados.

Carvajal (2002), evaluó el efecto patogénico de tres cepas de *P. fumosoroseus* aislados sobre sobre *E. colombianus*, obtuvo mortalidades entre 29 y 86% de mortalidad a una temperatura de 17 ° C con una concentración de $1x10^7$ después de 29 y 42 días de inoculación. Farfán, (2006) evaluó el efecto de diferentes formulaciones de *P. fumosoroseus* sobre ninfas y adultos de perla de la tierra. La formulación en granulado mostró mortalidadades de 35%, el doble que la obtenida con los polvos mojables, 15% de mortalidad 30 días después de inoculados. Lopera (2001), evaluó el efecto patogénico de varias cepas de *M. anisopliae* con una concentración de $1x10^8$ esporas/ml, las cuales no causaron ningún efecto patogénico después de 40 días de aplicación.

2.1.2.5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten considerar a la cepa nativa de *M. anisopliae* como una alternativa viable para el manejo de poblaciones de *E. colombianus* en cultivos de mora en el municipio de Ginebra.

2.1.2.6. Bibliografía

CARNEIRO, R. M. D. G.; SORIA, S. de J.; Kulczynki, S. M.; SILVA, J. B. Patogenicidad de *Paecilomyces fumosoroseus* isolado CG 259 à *Eurhizococcus brasiliensis* Hempel (Homoptera: Margarodidae). Anais da Sociedad de Entomológica do Brasil, v.23, n. 2, p. 345-348, 1994.

FOLDI, I. Y SORIA, S.J. Les Cochenilles nuisibles a la Vigne en Amerique du Sud (Homoptera: Coccoidea). En: Annals Soc. Ent. France. (N.S.), 1089.25 (4)411-430.

JAKUBSKI, A.W. 1965. A critical revision of the families Margarodidae and Termitococcidae (Hemiptera: Coccocidae). London; [s.n.], p.p. 171-181.

LOPERA, 2001. Evaluación de la patogenicidad de aislamientos de *Metharhyzium anisoplae* OSORIO J.C. 2005. Distribución radical de la perla de la tierra *Eurhizococcus colombianus* y relación con factores ambientales en mora. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Sede Medellín.

ZAPATA, P. 2009. El cultivo de la mora. Tesis especialización en frutales tropicales. Universidad Nacional de Colombia. 102 p.

2.1.3. Establecimiento de un protocolo para la multiplicación vegetativa de plántulas inoculadas con hongos biocontroladores como valor agregado y como estrategia preventiva para el manejo integrado de plagas y enfermedades en campo[5].

Objetivo del Proyecto (1): *Con la participación de agricultores, empresas comercializadoras y procesadoras seleccionar materiales élite de lulo y mora, con criterios de adaptabilidad, resistencia a enfermedades, productividad y aceptación del mercado.*

Objetivo del Proyecto (5): *Fortalecer la capacidad de agricultores y técnicos en el manejo integrado de los cultivos de mora y lulo y desarrollar capacidades de innovación en los actores de las cadenas productivas*

2.1.3.1. Objetivos

- Multiplicar plántulas limpias con sustrato tratado e inoculado con hongos biocontroladores, para beneficio social de los integrantes de ASOFAMORA.
- Evaluar la eficacia de productos biológicos como una alternativa eficaz para el enraizamiento y el manejo integrado de plagas y enfermedades de manera amigable con el medio ambiente desde el invernadero.
- Establecer en la vereda Costa Rica instalaciones para multiplicar vegetativamente *Rubus glaucus.*

2.1.3.2. Marco Referencial

La mora de castilla, *Rubus glaucus* Benth, ha sido cultivada por los agricultores de economía campesina de las zonas de ladera del Valle del Cauca (1800-2400 m.s.n.m.), especialmente en los municipios de Guacarí y Ginebra, adquirió importancia su cultivo por área y producción desde los años 1960, posibilitando la expansión del cultivo y la creación de una cooperativa de productores de mora con sede en el corregimiento de Costa Rica, municipio de Ginebra. Para la siembra de toda el área se utilizaron ecotipos nativos de la región: la mora ranchona, hartona y castilla. Esta área sembrada y su producción disminuyó paulatinamente a tal punto que el cultivo casi desaparece del municipio de Ginebra y Guacarí hacia el año 1998 a causa de malas prácticas de manejo como la multiplicación vegetativa por raíces o cepas y el acodo de punta con sustratos (suelo) extraídos de los lotes cultivados ya contaminados. Esta situación ha contribuido a que en la zona se presente un complejo de plagas y enfermedades limitantes para el cultivo de la mora, principalmente aquellas que tienen que ver con el sistema radical como: perla de la tierra *Eurhizococcus colombianus*, el picudo del cuello de la planta *Zascelis* sp y el barrenador de tallos, ramas y raíces *Hepialus* sp y pudrición de raíces *Verticillium* sp, *Fusarium* sp y *Rosellinia* sp.

[5] Pedro Zapata, Jaime Eduardo Muñoz y Herney Darío Vásquez.

Se están desarrollando en el Valle del Cauca programas de siembra y renovación de áreas de mora con el ecotipo “mora sin espinas” denominado también como “mora lisa” o “mora salentuna”. Este ecotipo está presentando excelente comportamiento en calidad, producción, vigor y adaptación pero hay que realizar evaluaciones de tolerancia a plagas y enfermedades y los riesgos que se presenten al sembrar un solo material genético. Como estrategia para corregir esta problemática se propone la elaboración de un protocolo para la selección, multiplicación vegetativa y la producción de plántulas empleando sustratos y semillas (esquejes) tratados e inoculados con mezcla de hongos biocontroladores; para ofrecer un material de excelente calidad y con tratamientos preventivos para el manejo de plagas y enfermedades del suelo en el campo.

Desde el año 2002, la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira por intermedio del Programa de Investigación en Diversidad Biológica y Frutales Tropicales, en su línea de investigación en mora ha colectado y caracterizado la diversidad biológica del sur occidente colombiano con marcadores morfológicos y moleculares y ha evaluado algunos métodos de multiplicación vegetativa con resultados que dependen del genotipo. ASOFAMORA (Asociación de Familias Productoras de Mora) en colaboración con FONTAGRO están estableciendo y renovando 60 hectáreas de mora sin espinas con 120 agricultores y ha decidido hacerlo con plántulas seleccionadas, limpias obtenidas en invernadero de acuerdo a un protocolo de multiplicación de semilla.

2.1.3.3. Metodología

a. Multiplicación de la mora de castilla sin espina por el método de esqueje o estaca, protocolo

Este es el método más recomendado en la multiplicación de la MORA SIN ESPINA, por razones fitosanitarias y genéticas, este método es el que más se está empleando en ASOFAMORA para la ejecución de sus planes se siembra, es el más conveniente y económico ya que:

- No se trasmiten plagas y enfermedades del suelo.
- Es el método por el cual se consigue mayor cantidad de material de estacas por planta mensualmente.
- Brinda varias alternativas de manejo al productor entre ellas la siembre directa en campo que ahorra hasta el 80% de los costos por semilla

Para la obtención de material de siembra por este método, se procede de la siguiente manera:

b. Preparación y alistamiento de la herramienta a emplear (manejo y tratamiento)

- Tijera podadora con buen filo
- Desinfectante (yodo al 10% o hipoclorito de sodio al 10%)

- Después de un día de trabajo lavar la tijera con agua y jabón, limpiar con alcohol y colocar 2 gotas de aceite.
- Guantes

Nota: durante la jornada de trabajo limpiar periódicamente la hoja de la tijera con la solución desinfectante (Figura 27).

Figura 27. Tratamiento de desinfección de la tijera durante el proceso. Foto de: Pedro A. Zapata

c. Selección de plantas madre en campo

Se hace necesario seleccionar las plantas 'madres' de las cuales se va a recolectar el material (Figura 28). Estas deben tener características de buena producción, calidad de fruta, vigorosas, tolerantes a plagas y enfermedades, y, que se encuentren adaptadas y aclimatadas a la región (Franco y Giraldo 2002)

Figura 28. Selección de plantas madre en campo. Foto de: Germán Franco.

Recolección de estacas en el campo

Una vez seleccionada la planta madre, se elegirán las ramas productivas en las que ya fueron cosechados sus frutos y se procede a dividir o cortar estacas con las yemas, las estacas deben tener consistencia leñosa o semileñosa y se cortaran del tercio medio de la rama, dejando aproximadamente 1 cm de rama secundaria o de pecíolo de hoja para proteger las yemas, el corte debe ser inclinado o en bisel (Figura 29). Una vez cortadas las estacas o esquejes se deben colocar en la sombra y se deben utilizar en el menor tiempo posible (Franco y Giraldo 2002).

Figura 29. Corte y recolección de estacas en campo. Foto de: Pedro A. Zapata

Figura 30. Tratamiento de estacas con Limón Rugoso. Foto de: Pedro A. Zapata

d. Tratamiento y desinfección de estacas

Después de la recolección de estacas se debe seguir el siguiente tratamiento de desinfección: Lave las estacas con agua limpia y desinfecte:

- ✓ Sumergir las estacas por 10 minutos en una solución de 1 parte de agua y 2 partes de jugo de limón (Figura 30)
- ✓ Sumergirlas durante media hora en: Previcur (IA: Propamocarb-HCl): 3 cc/litro.
- ✓ Dejar secar a la sombra durante 30 minutos y realice la siembra.

e. Construcción de Viveros

La multiplicación masiva de estacas, requiere de condiciones controladas como lluvia, humedad relativa y sombra, para lo cual se deben construir viveros con los materiales disponibles en la zona (guadua), utilizar plástico transparente calibre 6 y tela Sarán del 65 o 75%, los módulos no deben superar un área de 8 x 8 m (Figura 31).

Figura 31. Construcción de invernaderos en Campo con mínimo de insumos. Foto de: Pedro A. Zapata

f. Construcción de germinadores

Una vez tratadas y desinfectadas las estacas, se pueden colocar en camas de aserrín para que germinen (Figura 32), como se presenta a continuación:

- Construir una cama de material de guadua, a una altura de 60 cm del piso, y con las siguientes dimensiones: 1 m de ancho x 20 cm de profundidad x el largo necesario para el número de estacas que se desea sembrar.
- Utilizar como sustrato aserrín limpio y grueso de madera blanca.
- Desinfectar el aserrín utilizando agua hirviendo o por el método de solarización
- Una vez desinfectado el aserrín, proceder a sembrar las estacas de la siguiente manera:
  Ubicar las estacas en hilera y de forma horizontal sobre el aserrín, dejando un espacio de 2 cm entre estacas. Tapar completamente las estacas con una capa delgada de aserrín. Humedecer el germinador.
  Cubrir el germinador con un umbráculo construido en helecho o sarán.
  A los 20 o 30 días del trasplante, se presenta germinación de plántulas provenientes de las yemas de las estacas (parte aérea y parte radicular) (Figura 33). En ese momento las plántulas están listas para ser trasplantas al hoyo en el campo o se pueden cortar la fracción de estaca que tiene la plántula germinada y se puede sembrar en bolsa con suelo preparado.

Figura 33. Germinador con aserrín de pino pátula. Foto de: Pedro A. Zapata

Figura 32. Plántulas producidas en Germinadores de Aserrín. Foto de: Pedro A. Zapata

g. Construcción de almácigos

Las estacas se pueden llevar a bolsas plásticas con sustrato preparado en forma de siembra directa o plántula, como se presenta a continuación:

- **Preparación de medio o sustrato**

  - ✓ Utilizar suelo negro y de textura liviana que no se haya trabajado en agricultura, mezclar bien 3 partes de este suelo con una parte de materia orgánica compostada (por ejemplo pulpa de café descompuesta).
  - ✓ Tamizar la mezcla para sacar piedras, trozos de madera y para que quede homogénea
  - ✓ Desinfectar la mezcla por el método de solarización (Figura 34)
  - ✓ Llenar las bolsas como se presenta a continuación (Figura 35)

Figura 35 Preparación y mezcla adecuada del sustrato. Foto de: Pedro A. Zapata

Figura 34. Bolsas listas con sustrato tratado para el transplante de las plántulas. Foto de: Pedro A. Zapata

- **Llenado de bolsas**

Se utilizan bolsas de polietileno de color negro calibre uno y medio o dos, perforadas a los lados y al fondo y de un tamaño de 15 cm x 10 cm.

- **Siembra de la estaca**

Desinfectar la estaca como se mencionó anteriormente y sembrarla inclinada en la bolsa, dejando por fuera una yema.
Se puede sembrar la fracción de estaca ya germinada con la plántula en la bolsa.

- **Procedimiento para el trasplante de estacas con brotes o plántulas a la bolsa**

Este es el paso más delicado en el proceso de multiplicación debido a que el sistema radical de las plantas se puede lastimar, causando daño físico y posibilitando la entrada de microorganismos patógenos.
El procedimiento a seguir durante el trasplante es el siguiente:

- Debe llenarse la bolsa con el sustrato hasta llenar las ¾ partes de ella.
- La plántula traída del germinador se coloca cuidadosamente sobre la superficie del sustrato y se adicionan diez gramos de inóculo

comercial de micorriza de manera que quede en contacto con la raíz de la planta.
- Luego se agrega suavemente el sustrato restante para completar el llenado de la bolsa con la plántula.
- El cuello de la plántula debe quedar en el borde de la superficie del sustrato
- Regar inmediatamente (Burbano 2007).

- **Mantenimiento del almácigo**

Se deben regar periódicamente las bolsas de acuerdo a las condiciones climáticas, adicionar agua de tal manera que las plantas se mantengan en condiciones húmedas evitando el exceso de humedad.

h. Plan de "inoculación"

En el momento de trasplante o después de la germinación se les debe adicionar a las plantas como tratamiento preventivo una mezcla de los siguientes productos:

- A base de *Trichoderma harzianum* : 5 gr/litro
- A base de *Paecilomyces lilacinus* 4 gr/litro
- A base de *Metarhizium anisopliae* 4 gr/litro
- A base de *Beauveria bassiana* 4 gr/litro

Como alternativa se puede utilizar un producto comercial que reúna una mezcla de los hongos anteriores en una concentración de: 5 gr/litro (Castellanos y Botero 2003a) (Figura 36).

Figura 36. Tratamiento con hongos biocontroladores. Foto de: Ana Milena Caicedo

i. Plan de fertilización

Aplicar cada cinco días con el agua de riego la mezcla de los siguientes productos:

- Fosfacel (fosfato diamónico): 2 gr / litro
- Cosmocel (N-P-K- elementos menores) 2 g/ l.

Kelatex-Zinc: 1g/l (Ethylendiaminotetracetato Zn (ll) sódico),

Transcurrido un mes después de la germinación las plántulas están listas para el trasplante a campo.

El empleo de hongos entomopatógenos y antagónicos para el control de plagas y enfermedades de la rhizosfera de la planta de mora y almácigos.

El *Trichoderma* el cual fue seleccionado para ser utilizado como biocontrolador y promotor de raíces es un hongo nativo del suelo que crece y se desarrolla sobre

sustrato orgánico en descomposición. Presenta propiedades antagónicas sobre varios hongos fitopatógenos del suelo. El *Trichoderma* crece como un moho verde azul sobre los sustratos, produce gran número de esporas de fácil diseminación y crece mejor en suelos con pH superior a 6. Se produce fácilmente en laboratorio y su gran potencial reproductivo permite obtener niveles de inoculo muy alto en poco tiempo (Castro y Díaz 2001)

El trabajo se realizó en el vivero de ASOFAMORA localizado en el corregimiento de Costa Rica municipio de Ginebra (Valle) a una altura de 1200 metros sobre el nivel del mar, el cual fue dotado con fondos del proyecto. Se construyó con recursos de Fontrago un invernadero de 8 x 8 metros con cubierta de plástico trasparente calibre 6 y con malla sarán del 75% y se construyeron camas altas del suelo a una altura de 80 cm, 1 m de ancho por 7 m de largo, como sustrato se empleó aserrín de madera de pino patula. Como unidad experimental se utilizaron estacas de mora de castilla cultivar "mora sin espina" con 3 yemas vegetativas, cada una, y de un tamaño promedio de 18 a 20 cm, las cuales fueron seleccionadas por su sanidad y buen estado.

El material vegetal fue recolectado en el campo y llevadas al vivero en donde fueron divididas con tijeras podadoras. Para evaluar el efecto del hongo *trichoderma* sobre el enraizamiento de las estacas se emplearon los siguientes tratamientos (Figura 37):

T1 = Multibiol: (Inóculo comercial líquido que contiene *Trichoderma*)
T2 = Trichotropico: (Inóculo Comercial en polvo que contiene *Trichoderma*)
T0 = Limón y cristales de sábila (Control)

Se utilizaron 20 estacas por tratamiento con tres repeticiones (3 estacas x 3 tratamientos x 3 repeticiones = 180 estacas) (Figura 39).
Se realizó una aplicación de los tratamientos al inicio de experimento en dosis de 8 gramos por litro de los inóculos comerciales y para el tratamiento testigo con limón y cristales de sábila se empleó 50 % de agua y 50% de partes iguales de limón y cristales de sábila (Figura 38).

Figura 37. Estacas sometidas a los diferentes tratamientos. Foto de: Ana Milena Caicedo

Los tratamientos y sus repeticiones se distribuyeron al azar en las camas que contenían el sustrato enraizador.

Figura 39. Distribución de las estacas con los diferentes tratamientos en las camas. Foto de: Ana Milena Caicedo

Figura 38 Aplicación de los diferentes tratamientos en las camas. Foto de: Ana Milena Caicedo

Figura 40. Estacas evaluadas visualmente. Foto de: Pedro A. Zapata

Evaluación

Se evaluaron las variables: porcentaje de estacas que presentaron formación de brotes de follaje, porcentaje estacas que presentaron emisión de raíces y porcentaje de estacas que presentaron formación de brotes de follaje y emisión de raíces (plántulas) (Figura 40).

Esta evaluación se realizó a los 28 días después del trasplante de las estacas a las camas.

2.1.3.4. Resultados y discusión

Tabla 10. Resultados obtenidos en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTO	***Nº DE ESTACAS***	***% FORMACION BROTES***	***% FORMACION RAICES***	***% FORMACION BROTES + RAICES***
T0	***60***	***53***	***30***	***8***
T1	***60***	***66***	***46***	***28***
T2	***60***	***68***	***38***	***20***

Con relación al porcentaje de formación de brotes (tabla 10) se encontró una mejor respuesta con los tratamientos uno y dos (superior al 50%), que corresponden a los tratamientos con TRICHODERMA. Con respecto al porcentaje de formación de raíces los resultados son similares a los anteriores, los tratamientos uno y dos también mostraron una mejor respuesta. Para la formación de plántulas (brotes más raíces), aunque los resultados fueron bajos se ve una

tendencia a presentar los porcentajes más altos las plántulas inoculadas con TRICHODERMA, esto indica que puede existir un efecto del hongo en el enraizamiento de los esquejes (Figuras 41, 42,43).

Figura 41. Enraizamiento sin Trichoderma. Foto de: Pedro A. Zapata

Figura 42. Enraizmaiento con trichoderma (Multibiol). Foto de: Pedro A. Zapata

Figura 43. Enraizamieto con trichoderma (Trichotropico). Foto de: Pedro A. Zapata

Las estacas que producen solo brotes o raíces se siembran en bolsas y un alto porcentaje de ellas producen plantas completas. Este tipo de multiplicación tiene como ventajas con relación al que usan los agricultores de la zona que se producen plantas sanas (libres de plagas y enfermedades), porque provienen de plantas madres seleccionadas, corresponden a la variedad seleccionada, no se propaga la perla de tierra principal plaga de la zona, la cual causa porcentajes de mortalidad de plantas muy altas y es la principal causa de abandono de los cultivos. La utilización de plantas provenientes de estos sistemas de multiplicación garantiza el establecimiento de cultivos sanos con posibilidades de mayor duración y productividad

2.1.3.5. Conclusiones

- Los experimentos de enraizamiento con esquejes de Mora, empleando hongos antagónicos constituyen una alternativa ambientalmente sostenible para mejorar la producción de plántulas sanas en viveros.
- La manipulación y metodología de germinación del esqueje en camas con aserrín debe revisarse y ajustarse.
- Quedó establecido en una de las regiones con más tradición en el cultivo de mora una metodología e instalaciones adecuadas para producir plántulas

2.1.3.6. Bibliografía

BURBANO, B.M.I. 2007: Evaluación de los diferentes métodos de propagación de la Mora *(Rubus Glaucus Benth)* Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 91p.

CASTELLANOS, C.P.A; BOTERO, I.R.G. 2003: Producción de Mora. *(Rubus Glaucus Benth)* Con tutores vivos. COOPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA "COORPOICA". 105p.

CASTRO, R.D.; DIAZ, J.J. 2001: Alternativas para el manejo integrado para el cultivo de la Mora de Castilla *(Rubus Glaucus Benth)*. Universidad Católica de Oriente, Unidad de biotecnología vegetal. 73p.

FRANCO, G; GIRALDO C. 1998: El cultivo de la Mora. COOPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA "COORPOICA" 81p.

FRANCO, G; GIRALDO C. 2002: El cultivo de la Mora. COOPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA "COORPOICA" 79p.

2.1.4. Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de mora en el Valle del Cauca[6].

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

[6] Arenas, Adriana, Alvarez Elizabeth y González Alonso.

2.1.4.1. Objetivos

Objetivo General

Evaluar la variabilidad inter e intraespecífica del agente causante de la antracnosis en cultivos de mora (*Rubus glaucus*) del Valle del Cauca, mediante pruebas moleculares y de patogenicidad.

Objetivos Específicos

- Estandarizar pruebas de patogenicidad en laboratorio, y caracterizar patogénicamente aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis en cultivos de mora del Valle del Cauca.
- Identificar la(s) especie(s) de *Colletotrichum* asociada(s) a la Antracnosis en cultivos de mora del Valle del Cauca, mediante cebadores especie específicos (*Cg*Int , *Ca*Int2 y *Col*1) y SSCP.
- Determinar mediante la técnica molecular RAMS, la variabilidad intraespecífica de aislamientos **vallecaucanos** de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis en mora.

2.1.4.2. Marco Referencial

El cultivo de la mora se ve afectado por varias enfermedades, entre las más importantes se encuentra la antracnosis (*Colletotrichum* spp. Corda), el moho gris (*Botrytis cinerea*), el mildeo velloso (*Peronospora* spp), mildeo polvoso (*Oidium* spp.) (Franco et al. 2002), la roya (*Spirechina loeseneriana* o *Gerwasia lagerheim*), marchitez y pudrición de raíz (*Verticillium* spp., *Fusarium* spp., *Rosellinia* spp.) (Franco et al. 2000).

La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp., no se reporta como la principal limitante a la producción del cultivo de mora, sin embargo cada vez cobra mayor interés en el campo fitopatológico debido a que afecta entre el 53% y el 70% de los tallos de las plantas cultivadas (Tamayo 2003), presenta incidencias que pueden alcanzar el 100% (J. Zuleta, datos no publ.) y merece especial atención en todas las épocas del año.

La especie *C. gloeosporioides*, es un hongo de distribución cosmopolita predominante en los trópicos y subtrópicos (Sutton 1992), que muestra el mayor grado de diversidad morfológica, biológica y el más amplio rango de hospederos de todas las especies de *Colletotrichum* (Gaztambide 2005), afectando frutos como el de la manzana, aguacate, higo, cítricos, ají, tomate, calabaza, tomate de árbol, fresa (Johnston et al. 1997), mango, banano, papaya, guayaba y uva (Dodd et al. 1992).

C. acutatum Simmonds (1965) puede también causar una amplia gama de enfermedades de antracnosis sobre importantes cultivos económicos, de los

cuales la fresa es uno de los más importantes, afecta también frutos como la almendra, manzana, aguacate, arándano, cítricos, arándano agrio, uva, kiwi, papaya, melocotón, pacana, pimienta, y tomate (Guerber et al. 2001).

Las técnicas moleculares son una alternativa complementaria para la identificación de las especies de *Colletotrichum* que permiten establecer diferencias entre los aislamientos. El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar fragmentos de ADN, que mediante iniciadores como los ITS y los RAMS, generan copias de regiones específicas o al azar de la cadena de ADN (Starr et al. 1998), siendo de importancia para determinar la variabilidad genética de los organismos.

La gravedad de los daños causados por *Colletotrichum* spp. se debe a la carencia de conocimientos adecuados sobre el agente causante de la enfermedad y su hospedero. Las únicas herramientas de control a disposición de los agricultores son algunas prácticas culturales y el uso excesivo de agroquímicos, que resulta en alto contenido de residuos tóxicos, representando un riesgo para el consumidor por la aplicación directa sobre la fruta.

En consecuencia, es necesario llevar a cabo investigaciones como las del presente trabajo en el que se realizó la caracterización molecular y patogénica de *Colletotrichum* spp., aislado de cultivos de mora del Valle del Cauca (Colombia), las especies asociadas con la enfermedad se identificaron mediante el uso de cebadores específicos y el análisis del polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP). Dentro de cada especie identificada se evaluó la variabilidad y composición poblacional del patógeno, mediante el empleo de micro satélites amplificados al azar RAMS (Random Amplified Microsatellite por sus siglas en inglés), y pruebas de patogenicidad en 53 aislamientos inoculados en material de mora con susceptibilidad intermedia.

Estos resultados contribuyeron a una mayor comprensión de la enfermedad, proporcionando herramientas útiles para posteriores estudios relacionados con el diseño de alternativas tecnológicas para el manejo integrado de la antracnosis en mora, de modo que se generen cambios encaminados a mejorar significativamente el estado fitosanitario del cultivo de la mora.

2.1.4.3. Metodología

Colecta de muestras

La colecta de tejido de mora de Castilla afectado por Antracnosis se realizó en los municipios productores de ésta fruta en el Valle del Cauca (Colombia): Buga, Tuluá, Ginebra, Palmira, Cerrito, Guacarí, Trujillo, Jamundí y Dagua.

La caracterización patogénica y molecular de los aislamientos se realizó en el Laboratorio de Patología de Frutas del Centro Internacional de Agricultura Tropical, ubicado en la ciudad de Palmira (Colombia), a una altura de 965 msnm,

temperatura promedio 24ºC, humedad relativa de 76% y una precipitación media anual de 965mm.

Para la obtención de las muestras se visitaron cultivos de mora en los que se colectaron mínimo cuatro muestras de tallo y/o fruto con síntomas típicos de la enfermedad como lesiones ovales de color violáceo alrededor de la espina, muerte descendente de ramas, frutos momificados o con necrosamiento en drupas. Las muestras de fruto y tallo (3-5 estacas de 20 cm) fueron cortadas, cada muestra fue depositada en una bolsa de papel debidamente etiquetada, protegida por una bolsa plástica. Se conservaron en una nevera de icopor acondicionada con bloques de hielo hasta el momento de ser procesadas. Cada sitio de colecta fue geo- referenciado mediante el empleo de un geoposicionador satelital Etrex – Garmin (Taiwán).

Obtención de aislamientos monospóricos

- Esporulación en medio de cultivo Agar Marthur
- Esporulación en cámara húmeda
- Crecimiento del aislamiento monospórico ace
- Almacenamiento del cultivo monospórico

Pruebas de patogenicidad

Para llevar a cabo la prueba de patogenicidad se realizó un ensayo piloto con seis de los 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp. Cada aislamiento fue inoculado en tres ecotipos de mora denominados por los agricultores Castilla, Hartona y Sin Tuna, los cuales han registrado bajo condiciones de campo reacciones de susceptibilidad, resistencia y alta resistencia respectivamente. Se evaluó el mismo material para todos los ecotipos excepto Castilla donde se evaluaron dos materiales, los cuales bajo condiciones de campo presentaron diferencias en su comportamiento frente a la antracnosis: el primero procedente del municipio de Buga, y con una incidencia del 90% de antracnosis fue designado como Castilla susceptible y el segundo procedente del municipio de Guacarí y con una incidencia del 8% de antracnosis, fue designado como Castilla intermedio.

Se realizaron evaluaciones al día 1, 2, 3, 6, 7, 9, y 12 después de la inoculación. En las evaluaciones se midió el largo y ancho de la lesión y se multiplicaron ambos valores entre sí para efectos de comparación; con el valor arrojado por la multiplicación se calculó el porcentaje del tamaño de la lesión denominado área de la lesión. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el ecotipo Castilla intermedia para inocular los 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp., utilizando para ello la metodología descrita, excepto que se establecieron 5 repeticiones y los tiempos de evaluación fueron al día 5, 9, 13, 17 y 21 después de la inoculación.

Pruebas moleculares

Extracción de ADN: Se extrajo el ADN de 53 aislamientos monospóricos seleccionados, siguiendo el protocolo de Mahuku (2004) con modificaciones reportadas por ÁÁlvarez et al. (2004).

PCR con cebadores específicos: la identificación molecular de las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en mora de Castilla, se realizó mediante PCR, amplificando las regiones específicas del ADN ribosomal del hongo, mediante el cebador universal ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') en combinación con los cebadores especie específicos para *C. gloeosporioides* (*Cg*Int) (5'GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG3'), *C. acutatum* (*Ca*Int2) ((5'-GGGGAGCCTCTCGCGG-3') y con el cebador taxón específico (*Col*1) (5'-GCCGTCCCCTGAAAAG-3') (Afanador et al. 2003) para una especie aún no identificada asociada con algunos frutales tropicales.

Identificación de especies mediante análisis SSCP: la identificación de las especies de *Colletotrichum* realizada previamente con cebadores especie específicos se confirmó mediante el empleo de electroforesis SSCP (del inglés Single-strand-conformation polymorphism) de la región 5.8S interna transcrita (ITS) del ADN ribosomal empleando la metodología desarrollada por Kong et al. (2004).

Amplificación al azar de microsatélites (RAMS): inicialmente se evaluaron los cebadores CCA (DDB $(CCA)_5$), CGA (DHB $(CGA)_5$), GT (VHV $(GT)_5$ G), AG (HBH $(AG)_7$ A), CT (DYD (CT) $_7$C), TG (HVH (TG) $_7$T), ACA (BDB$(ACA)_5$) y CA(DBDA (CA) $_7$), donde los sitios degenerados pueden remplazar las bases entre paréntesis para H (A, T o C), B (G, T o C), V (G, A o C) y D (G, A o T) con seis muestras representativas por especie y la mayoría de zonas de muestreo, con el fin de determinar el grado de polimorfismo ofrecido por éstos.

Electroforesis en agarosa: el producto amplificado de RAMS se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.1 ppm) empleando buffer TBE 0.5X (Trisma base, ácido bórico y ETDA), a 100 V. En cada gel se incluyó 5 µl de marcador de peso molecular de 1 Kb; las bandas se visualizaron bajo luz ultra violeta y la imagen obtenida se capturó utilizando un lector de geles Gel Doc 2000 (BioRad, USA Inc.).

Análisis estadístico

Para establecer los niveles de patogenicidad, se emplearon datos obtenidos a partir del área de la lesión desarrollada sobre el tallo, y se analizaron por medio del programa Statistic versión 8.0 (Analytical Software, St. Paul, Minn) según un diseño completamente al azar para cada día de evaluación y para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Para todos los días de evaluación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Dunnett (POSTANOVA) con un nivel de significancia del 5% que permitió

determinar los aislamientos que presentaron diferencias significativas frente al control.

Con base en los perfiles de bandas generados por los cebadores universales seleccionados, los fragmentos de ADN se analizaron como un carácter independiente y los del mismo tamaño se consideraron como un representante del mismo locus genético; generando así una matriz binaria de ausencia (0) y presencia (1) para los 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp., y el grupo externo comprendido por las especies *Phaeoisariopsis griseola* y *Colletotrichum lindemuthianum*.

Se realizó un análisis de correspondencia múltiple mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute Inc. 2000). El análisis asocia todos los aislamientos con las características con que fueron calificados, es decir, asocia todas las filas con las columnas determinando el nivel de proximidad o asociación. Empleando el paquete estadístico POPGEN versión 1.32 (Yeh et al 1999), se calculó la heterocigocidad promedio (h) de acuerdo a la fórmula de Nei (1973) y el porcentaje de loci polimórficos, para cada uno de los cebadores, las especies y la población general.

2.1.4.4. Resultados y discusión

Caracterización morfológica del material colectado

En campo la mayor incidencia de la antracnosis en mora de Castilla del Valle del Cauca, se observó en los municipios de Jamundí, Dagua, Buga y Palmira, con valores estimados entre 80 y 100%. La menor incidencia de la enfermedad se registró en algunas fincas de los municipios de Ginebra, Guacarí, Tuluá, Cerrito y Trujillo, con valores entre el 5 y 20%.

Los ecotipos donde se aisló *Colletotrichum* spp., en mora de Castilla fueron principalmente Castilla y Hartona, encontrándose en una menor proporción la Regional, Hartona Negra, Hartona Blanca, y Ranchona.

El 98% de los aislamientos fueron obtenidos a partir de lesiones ovales de color púrpura desarrollados en la base de las espinas del tallo, sobre las que se observó el desarrollo en cámara húmeda de acérvulos y masas de esporas color salmón (Figura 1) y el 2% restante se obtuvo de fruto a partir de las masas de esporas color salmón.

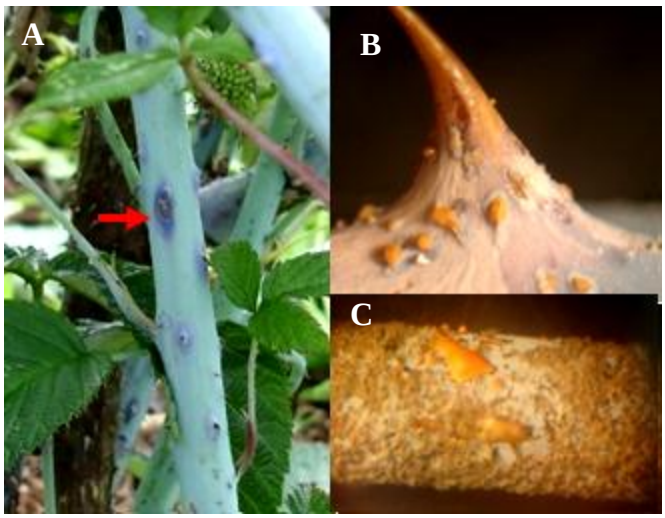


Figura 1. Síntomas y signos típicos de antracnosis en tallos de mora de Castilla. A: lesión oval típica color púrpura en tallo, B: acérvulos y masas de esporas color salmón sobre la espina, C: Acérvulos y masas de esporas color salmón en tallo.

Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp.

Mediante una evaluación macroscópica y microscópica de las colonias, se confirmó que los 53 aislamientos pertenecen al género *Colletotrichum* spp., observándose en medio PDA características como micelio de color verde oliva a grisáceo o blanco crema, presencia de acérvulos con masas de esporas de color salmón; en algunos casos, con características típicas de la especie *C. acutatum*, con forma ahusada y ápices agudos (Figura 2A, 2B y 2E) y en otros, típicas de la especie *C. gloeosporioides*, con conidias cilíndricas de ápices redondeados (Figura 2C, 2D y 2F).

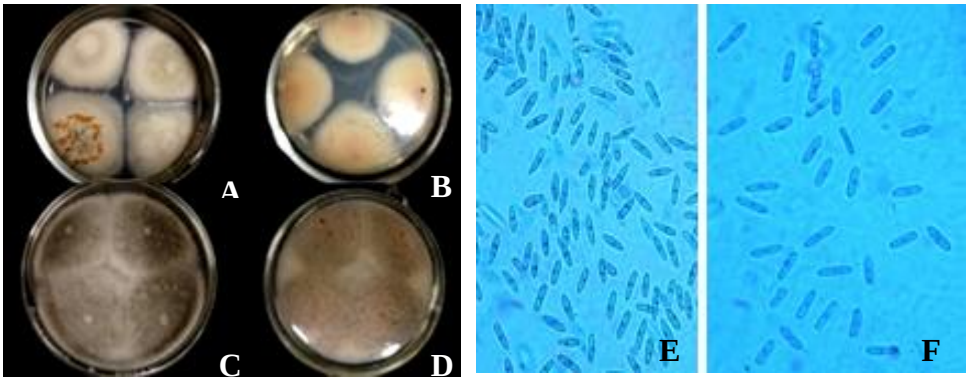


Figura 2. Colonias típicas de *Colletotrichum* spp., en medio PDA y estructuras reproductivas. A y B: Colonias de *C. acutatum*; C y D: colonias de *C. gloeosporioides*; E y F: esporas típicas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* respectivamente.

Establecimiento de un cepario

A partir de las colectas realizadas, se estableció el cepario con 80 aislamientos de *Colletotrichum* spp., provenientes de los principales municipios productores de mora del Valle del Cauca. La colección se conserva en forma de cultivos

monospóricos guardados en papel filtro a -20 ºC, en el laboratorio fitopatología de frutas del CIAT. Para este estudio se seleccionaron 53 aislamientos del cepario, representativos en el número de municipios, fincas y ecotipos aislados.

Patogenicidad

Los síntomas observados en los tallos inoculados con *Colletotrichum* spp. bajo condiciones de laboratorio consistieron en manchas generalmente ovaladas con bordes irregulares de color violáceo o negro, que avanzaron en forma diferente entre los aislamientos lo que permitió relacionar el área de lesión con el nivel de patogenicidad. Los controles (tallos inoculados con bloques de agar sin micelio) no presentaron ningún tipo de síntoma a través de los 21 días de duración del experimento. En la Figura 3 se presenta el avance del progreso de la enfermedad del aislamiento DaJ-46C1 inoculado en un único clon Castilla.

Figura 3. Daño causado por *Colletotrichum* spp. en segmentos de tallos de mora del clon Castilla para el aislamiento DaJ-46C1.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P<0.001$) entre los aislamientos para el área de la lesión (cm^2), durante todos los días de evaluación y para el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Se establecieron cinco niveles de patogenicidad: muy alto, alto, intermedio, bajo y no patogénico. Los niveles patogénico alto e intermedio se seleccionaron a partir de los aislamientos que presentaron diferencias significativas frente al control durante los días de evaluación, y los niveles de patogenicidad bajo y no patogénico se determinaron de acuerdo a la separación de medias LSD en el ABCPE.

De los 53 aislamientos evaluados el 3.8% no produjo síntomas en los tallos inoculados (aislamientos GiC-23T y TuL-98), el 22.6% resultaron con un nivel de patogenicidad bajo, el 43.4 % presentaron un nivel intermedio, el 17% un nivel alto y el 13.2% presentaron un nivel de patogenicidad muy alto.

En la Figura 4 se muestra que los aislamientos de los municipios de Trujillo, Guacarí y Buga son los más diversos en cuanto a niveles de patogenicidad, presentando niveles muy altos, altos, intermedios y bajos. Palmira, Jamundí y Dagua tienen un nivel intermedio de patogenicidad, y Ginebra fue el único municipio con aislamientos sin nivel intermedio, presentando solo aislamientos en los niveles de baja patogenicidad (50% del total de aislamientos de baja patogenicidad) y no patogénico (50% del total de aislamientos de los no patogénicos).

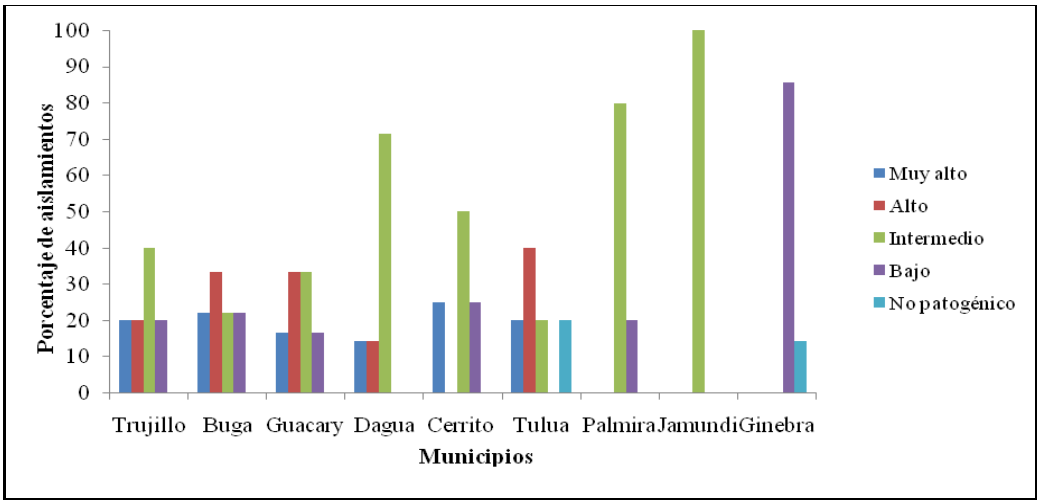


Figura 4. Nivel de patogenicidad por municipio de 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp. inoculados en tallos de mora clon Castilla del Valle del Cauca.

Los aislamientos de nivel patogénico muy alto se aislaron de los ecotipos Castilla (57.1%), Hartona (14.3%), Hartona negra (14.3%) y Regional (14.3%); los aislamientos no patogénicos se encontraron en Hartona negra (50%) y Hartona blanca (50%). Los ecotipos de los cuales se obtuvieron aislamientos con mayor diversidad en los niveles de patogenicidad fueron Regional y Hartona (Figura 5).

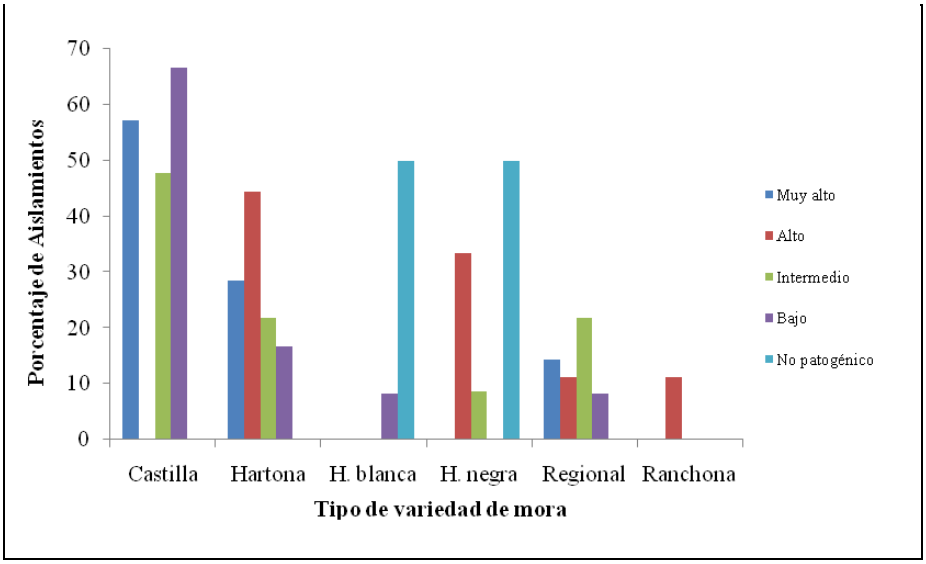


Figura 5. Porcentaje de los aislamientos con diferentes niveles de patogenicidad (muy alto, alto, intermedio, bajo y no patogénico) obtenidos a partir de distintitos ecotipos de mora del Valle del Cauca.

Se encontraron diferencias significativas ($F=34.3$; $P<0.001$) entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, con respecto a la patogenicidad de los aislamientos, resultados de patogenicidad demostraron que ***C. gloeosporioides* es más patogénico que *C. acutatum***. Ginebra es el municipio que posee el mayor porcentaje de aislamientos pertenecientes a la especie *C. acutatum* dentro de la cual el 50% pertenecen al nivel bajo y el otro 50% al nivel no patogénico.

Identificación de especies mediante la amplificación de los cebadores especie específicos

El ADN obtenido utilizando el método de extracción Mahuku et al (2004) con modificaciones (Álvarez et al. 2004), fue de buena calidad y con concentraciones entre los 5 ng/µL y 83ng/µL (Figura 6). Los cebadores taxón-específico *Ca*Int2 para la especie *C. acutatum* en combinación con el iniciador ITS4 amplificaron un fragmento de 490-pb y el cebador *Cg*Int para la especie *C. gloeosporioides,* en combinación con el ITS4 amplificaron un producto de ADN de 450-pb (Figura 7, 8)

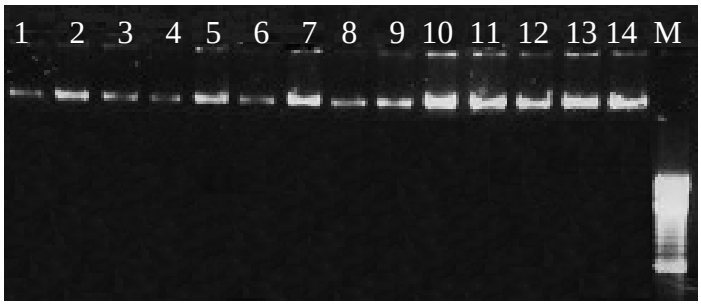


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de ADN genómico total de *Colletotrichum* spp. aislado de mora de Castilla del Valle del Cauca.

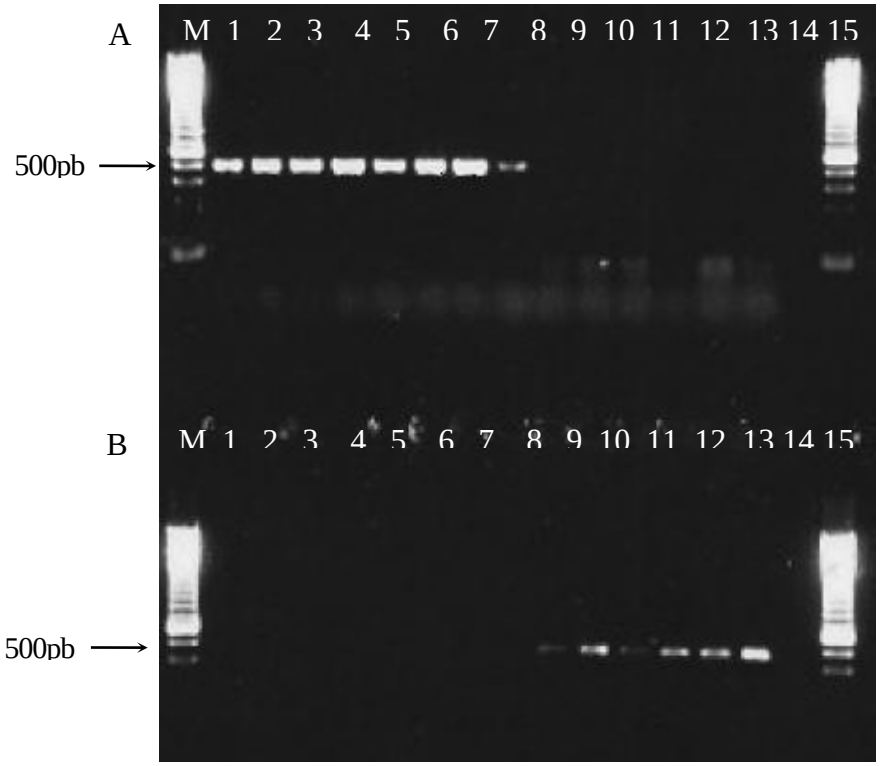


Figura 7. Visualización en gel de agarosa al 1.2%. de 14 aislamientos amplificados mediante los cebadores taxón-específico. A: cebador *Ca*Int2 para la especie *C. acutatum* y B: cebador *Cg*Int para la especie *C. gloeosporioides*. M: marcador de peso molecular de 100pb, 1: Gi-20t, 2: GiC-23f, 3: GiC-23t, 4: GiP-17C1, 5: GiP-17C2, 6: BuM-66, 7: GuL-81, 8: GuL-89, 9: PaA-35, 10: DaJ-46C1, 11: DaJ-46C2, 12: DaJ-50, 13: DaJ-51, 14: DaJ-59, 15: Control negativo.

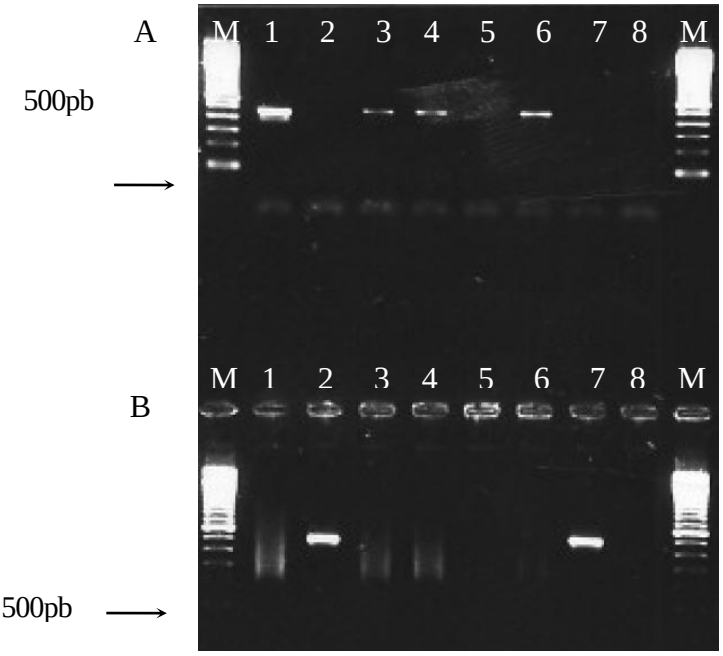


Figura 8**.** Visualización en gel de agarosa al 1.2% de los controles referencia y cuatro aislamientos (Identificados como *C. gloeosporioides* excepto GiC-20t) amplificados mediante los cebadores taxón-específico. A: *Ca*Int2 y B: *Cg*Int. M: marcador de peso molecular de 100pb, 1: DaJ-50, 2: GiC-20t, 3: GuL-81, 4: GuL-93, 5: Col1, 6: GND-1 C (Control referencia para *C. gloeosporioides*), 7: TOM 009 (Control referencia para *C. acutatum*), 8: Control negativo, M: marcador de peso molecular de 100pb

Los productos de amplificación con los cebadores especie-específicos indican que el 19% de los aislamientos provenientes de mora de Castilla del Valle del Cauca pertenecen a la especie *C .acutatum*, el 81% pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*, y ninguno a la población de *Colletotrichum* spp*.* El aislamiento 79C1 mostró una reacción inespecífica, no amplificando para ninguno de los cebadores especie específico; sin embargo, mediante el patrón SSCP, amplificó para la especie *C. gloeosporioides*.

Electroforesis SSCP

Los 53 aislamientos amplificaron con los cebadores ITS1-ITS4 generando un fragmento de 580 pb en gel de agarosa 1.2%. A partir de dicho fragmento y empleando la técnica de SSCP se observó un patrón de bandas característico para las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* al igual que para los controles *Phaeoisariopsis griseola*, *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum* spp.

Las especies *C .gloesporioides* y *C. acutatum* presentaron un patrón conjunto de cinco bandas; la banda 3 fue común a ambas especies y las bandas 2, 10 y 11 fueron específicas para cada especie. La estructura secundaria de las bandas 10 y 11 permitieron una movilidad electroforética mediante SSCP mayor a la de las demás bandas y fueron útiles para diferenciar *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*

respectivamente, corroborando así la identificación de los aislamientos con los cebadores especie-específicos (Figura 9).

Para la electroforesis de los SSCP, 43 aislamientos fueron identificados como *C. gloeosporioides* y 10 aislamientos como *C. acutatum*; ninguno de los aislamientos de mora Castilla presentó el patrón correspondiente a la especie no identificada de *Colletotrichum*. Adicionalmente para los aislamientos BuM-66 y PaA-35 previamente identificados como *C. gloesporioides* mediante cebadores específicos se encontraron tres bandas adicionales (Figuras 9 y10), aunque estas variaciones no enmascaran el patrón en los SSCP. Los controles referencia *P. griseola* y *C. lindemuthianum*, presentaron un patrón de seis bandas; la banda 6 fue compartida por ambas especies y las bandas 3, 7, 12 y 13 fueron específicas para cada una. La especie no identificada de *Colletotrichum* presentó un patrón de tres bandas, dos de ellas compartida con las especies *C. gloeosporioides* y una particular de la especie. El patrón general presentado por cada control referencia, fue utilizado como base para identificar los 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp. de mora de Castilla.

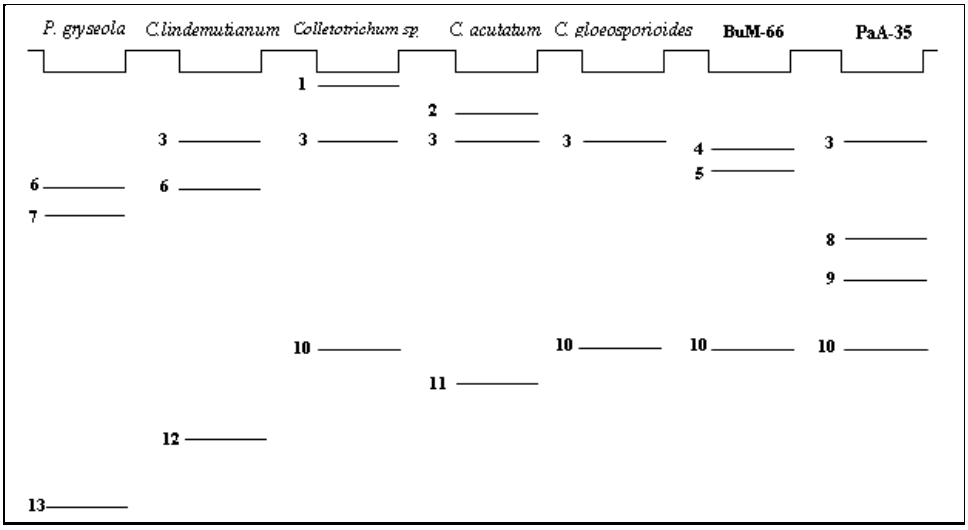


Figura 9. Representación esquemática de los patrones de SSCP hallados para las especies *P. griseola*, *C. lindemuthianum, Colletotrichum* spp., *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* durante la electroforesis de un gel no desnaturalizante.

RAMS

Se generó una matriz de 112 bandas de carácter polimórfico a partir de los cebadores ACA, CA, GT, CT y AG. El número de bandas por cebador varió de 17 (CT) a 33 (AG). Se encontraron 15 bandas exclusivas para el grupo externo (*P. griseola*, *C. lindemuthianum*), 4 bandas particulares y 3 no polimórficas para la especie *C. acutatum* y 3 bandas particulares y 1 no polimórfica para *C. gloeosporioides*. La Figura 11 presenta un ejemplo del perfil de amplificación RAMS para el cebador GT.

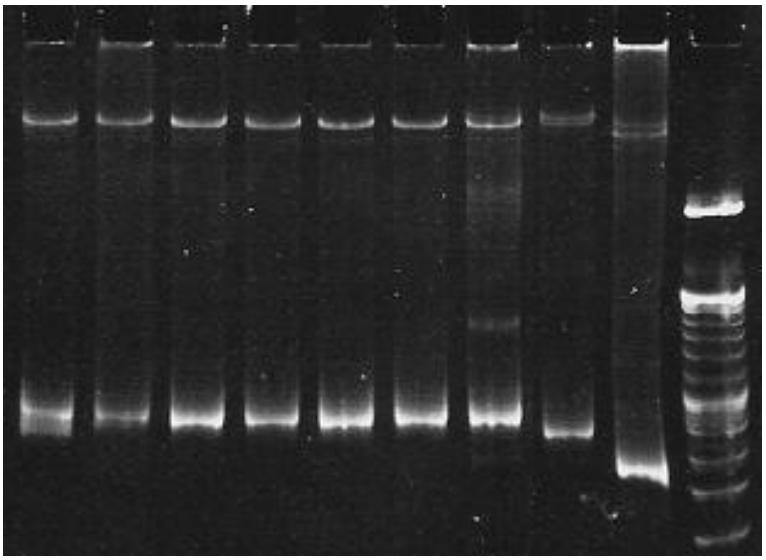


Figura 10. Electroforesis SSCP de *Colletotrichum* spp. en gel de poliacrilamida. 1-6. aislamientos que amplificaron para *C. gloeosporioides* con los cebadores específicos, 7. *C. gloeosporioides,* 8. *C. acutatum*, 9. *C. lindemuthianum,* M. Ladder 1kb.

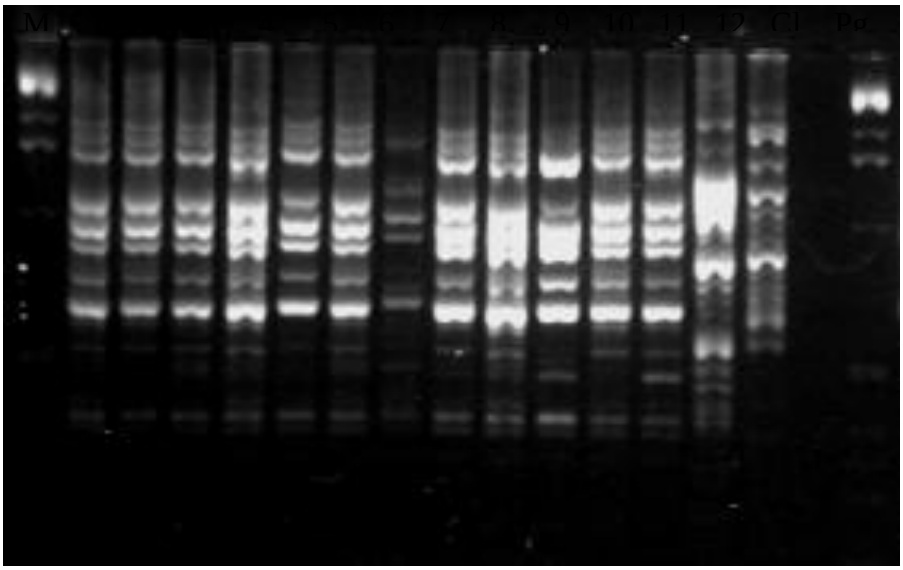


Figura 11**.** Patrones de bandas gnerados por el cebador GT. M: marcador de peso molecular de 1Kb, 1-3: aislamientos TrC-106, TrC-107 y TrS-117, 4-7: aislamientos CeR-122, CeR-123, CeR-126, CeR-128 8-12: aislamientos JaN-143, JaN-147as, JaN-147co, JaN-149 y JaN-151, Cl: *C. lindemuthianum* , Pg: *P griseola* , (-): Control negativo, M: marcador de peso molecular de 100pb.

Coeficiente de similitud de Nei-Li

El análisis para los 53 aislamientos, a un valor de 0.47, diferenció las dos especies de *Colletotrichum* halladas, las cuales generaron el grupo A para la especie *C. gloeosporioides* y el grupo B para la especie *C. acutatum* (Figura 12). El grupo externo C. *lindemuthianum* se separó de las especies *C. gloeosporioides* y *C.*

acutatum a un coeficiente de similitud de 0.34, mientras que *P. griseola* lo hizo a un coeficiente de similitud de 0.305.

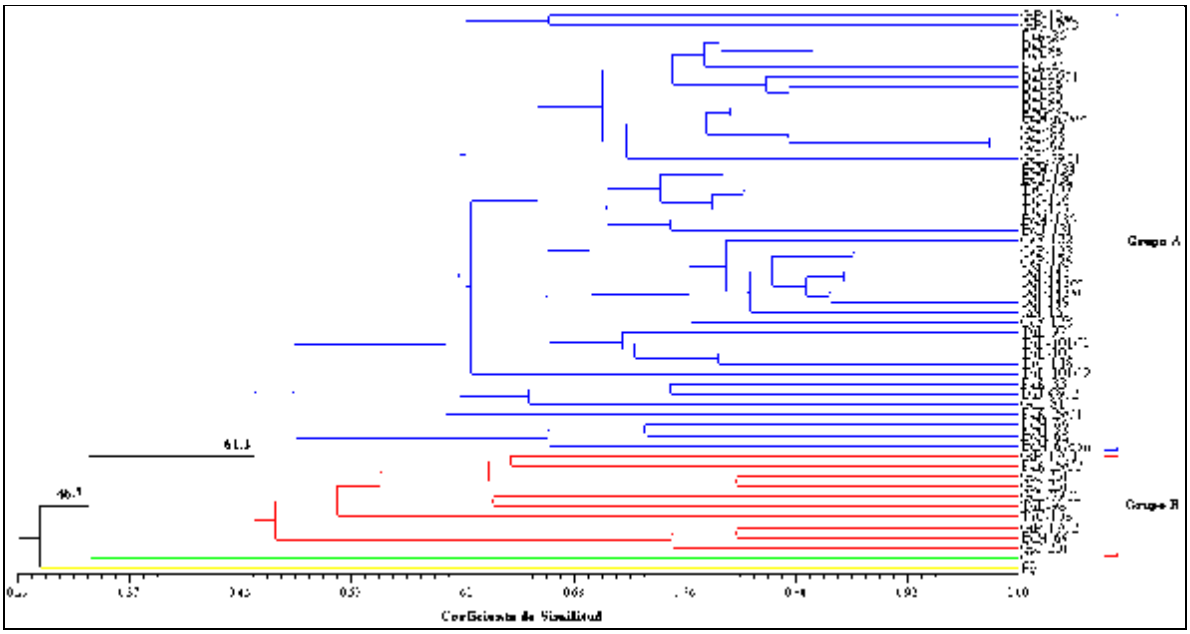


Figura 12. Dendrograma de la estructura genética de los 53 aislamientos de *Colletotrichum* spp. basados en el Coeficiente de Similitud de Nei-Li y calculado de los datos combinados de los cinco cebadores Microsatélites RAMs, con el método de clasificación UPGMA.

Con el fin de facilitar la presentación de las relaciones genéticas entre los aislamientos se construyeron dendogramas separados para cada especie. El primero, incluye todos los aislamientos de *C. gloeosporioides* (grupo A), el cual forma 8 subgrupos a un coeficiente de similitud de 0.665 (Figura 13). El subgrupo A1 lo conforman dos aislamientos de Ginebra (100%) ambos de baja patogenicidad. El subgrupo A2 está conformado principalmente por el 86% de aislamientos de Dagua, el 80% de Guacarí y el 40% de Palmira, siendo el 40% de los aislamientos de nivel patogénico alto. El subgrupo A3 lo conforman aislamientos de Trujillo (100%), Cerrito (100%), Jamundí (100%), Tuluá (75%), y Buga (50%), con el 57% de aislamientos de patogenicidad muy alta. El subgrupo A4 lo conforma un aislamiento de Tuluá de nivel intermedio. El subgrupo A5 está conformado por un aislamiento de Dagua con un nivel de patogenicidad alto y otro de Palmira de nivel intermedio. Un aislamiento de Guacarí de nivel patogénico alto conforma el subgrupo A6. Al subgrupo A7 pertenece un aislamiento de Palmira de nivel intermedio de patogenicidad, y el subgrupo A8 está conformado por los niveles: muy alto, alto e intermedio pertenecientes al municipio de Buga.

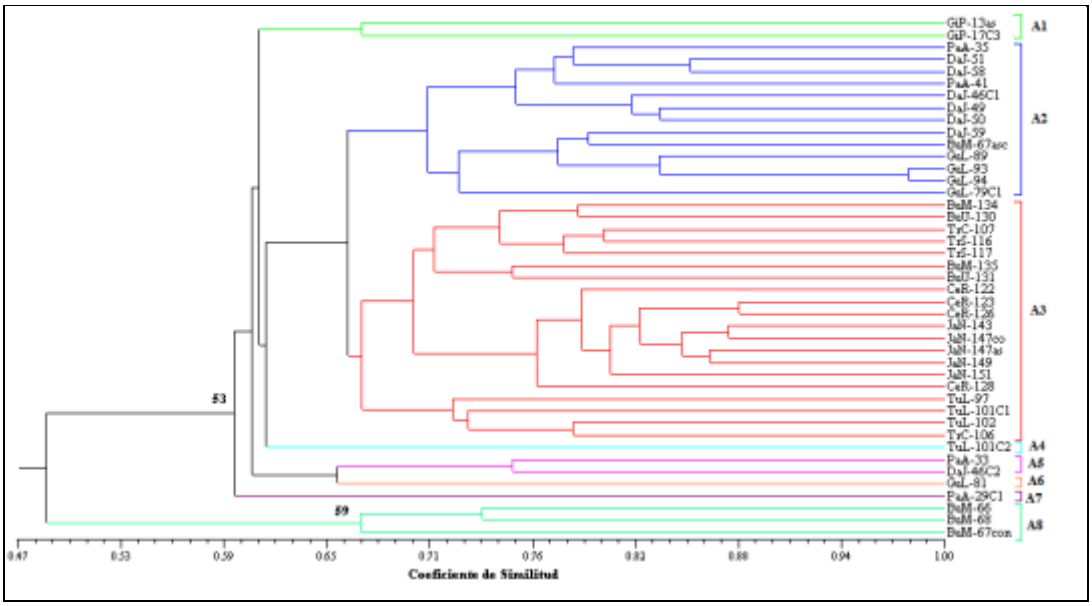


Figura 13. Dendrograma de la estructura genética de *Colletotrichum gloeosporioides* basados en el Coeficiente de Similitud de Nei-Li.

En cuanto a *C. acutatum* (grupo B) se diferenciaron 4 subgrupos a un coeficiente de similitud de 0.62 (Figura 14). El subgrupo B1 lo conforman aislamientos de Ginebra (60%) y Palmira (100%) con los niveles de patogenicidad bajo (37.5%) y no patogénico (50%). El subgrupo B2 está conformado por el 100% de los aislamientos de Guacarí y el 100% de Tuluá con niveles bajo de patogenicidad (12.5%) y no patogénico (50%). El subgrupo B3 lo conforma un aislamiento de Trujillo (100%) de baja patogenicidad (12.5%). El subgrupo B4 está conformado por el 37.5% de aislamientos de baja patogenicidad pertenecientes a los municipios de Ginebra (40%) y Buga (100%).

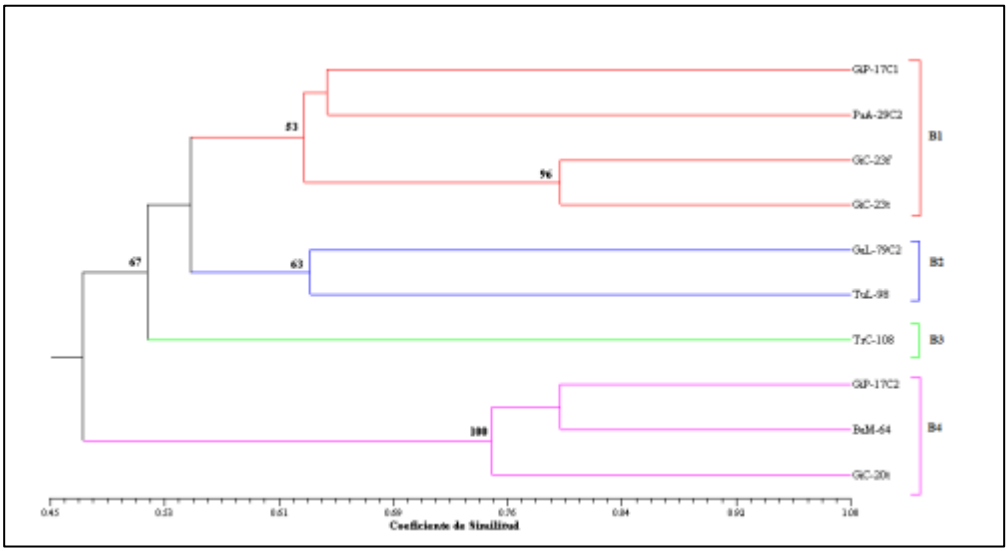


Figura 14. Dendrograma de la estructura genética de *Colletotrichum acutatum* basados en el Coeficiente de Similitud de Nei-Li y calculado de los datos combinados de los cinco cebadores Microsatélites RAMs, con el método de clasificación UPGMA.

Diversidad genética

Los valores de heterocigosidad de Nei (1973) hallados para cada uno de los cinco cebadores evaluados varió entre 0.2699±0.1525 (cebador CT) y 0.3589±0.1613 (cebador CA) y todos presentaron un 100% de loci polimórficos.

Los análisis de diversidad genética para el conjunto de los cinco cebadores, mostraron que los aislamientos de *Colletotrichum* spp., son variables con una diversidad total (H_T) de 0.3094±0.0268 y una diversidad dentro de cada municipio evaluado (H_S) de 0.2074±0.0116. La heterocigosidad de Nei (1973) para los aislamientos como una población total fue de 0.3122±0.1620 lo que revela polimorfismo genético. Para *C. gloeosporioides* el h fue de 0.2741± 0.1833, el H_T de 0.2760±0.0336 y el H_S de 0.1598±0.0125, y para *C. acutatum* el h fue de 0.3205±0.1517, el H_T de 0.3331±0.0249 y el H_S de 0.0403±0.001 para *C. acutatum.*

El municipio de Ginebra exhibió el valor más alto tanto de heterocigosidad de Nei (0.2870±0.1613) para el total de los cebadores y para el porcentaje de loci polimórficos (86.61%). El análisis de heterocigosidad de Nei para Ginebra por especie permitió determinar la influencia en dicho resultado de las dos especies, encontrándose un valor de 0.1073±0.1823 para *C. gloeosporioides* y un valor de 0.2421±0.1953 para *C. acutatum*. El municipio de Jamundí presentó el valor más bajo tanto de heterocigosidad de Nei (0.1005±0.1771) como para porcentaje de loci polimórficos (27.68%).

La AMOVA para los 53 aislamientos siguiendo el agrupamiento por municipios mostró que el 19.18% de la variación genética es atribuida a las diferencias entre los municipios con un nivel de confianza del 0.01%, y el 80.82% dentro de los mismos municipios. El índice de diferenciación genética (F_{ST}) encontrado fue de 0.192 ($P < 0.001$). El AMOVA para cada una de las especies arrojó que la variación genética atribuida a las diferencias entre los municipios para la especie *C. gloeosporioides* fue de 23.40 % ($P<0.001$) y la restante variación 76.60% se presentó dentro de los municipios, con un F_{ST} de 0.234. La variación genética atribuida a las diferencias entre los municipios para *C. acutatum* fue de 11.59% ($P<0.001$) y el 88.41% dentro de los mismos, con un F_{ST} de 0.116.

Esto sugiere que las diferencias entre municipios es más marcada para la especie *C. gloeosporioides*. El F_{ST} para cada cebador fue variable, desde 0.133 para el cebador ACA hasta un máximo de 0.356 para el cebador AG; los demás cebadores presentaron los siguientes valores AC 0.139, CT 0.144 y GT 0.156, los cuales son apropiados para determinar diferencias genéticas según criterio de Wright (1978).

En cuanto a los niveles de patogenicidad establecidos analizados con los datos de RAMS, permitieron observar que el nivel patogénico bajo presenta el más alto (0.3153±0.1395) índice de diversidad genética mientras que el nivel no patogénico (0.1627±0.235) muestra el menor índice.

Distancia genética

La Tabla 1 muestra que los municipios de Guacarí y Trujillo presentan el valor más bajo de distancia genética (0.0572) y el más alto de identidad genética (0.9444), mientras que los municipios Ginebra y Jamundí poseen el valor más alto de distancia genética (0.2787) y el más bajo de identidad genética (0.7567), éstos resultados pueden observarse en árbol obtenido por medio del análisis UPGMA (Figura 15).

Tabla 1. Distancia e identidad genética insesgada de Nei (1978) por municipios. Identidad genética (sobre la diagonal) y distancia genética (debajo de la diagonal)

Municipios	Ginebra	Palmira	Dagua	Buga	Guacarí	Tuluá	Trujillo	Cerrito	Jamundí
Ginebra	****	0.9189	0.8341	0.9225	0.9035	0.8849	0.8626	0.7632	0.7567
Palmira	0.0846	****	0.9178	0.9153	0.9172	0.8796	0.8875	0.8496	0.8120
Dagua	0.1815	0.0858	****	0.8988	0.9073	0.8526	0.8967	0.8220	0.8058
Buga	0.0806	0.0885	0.1066	****	0.9301	0.9152	0.9271	0.8499	0.8454
Guacarí	0.1015	0.0864	0.0973	0.0724	****	0.9426	0.9444	0.8585	0.8729
Tuluá	0.1223	0.1283	0.1594	0.0886	0.0591	****	0.9252	0.8642	0.8699
Trujillo	0.1477	0.1194	0.1090	0.0757	0.0572	0.0777	****	0.8814	0.9026
Cerrito	0.2702	0.1630	0.1960	0.1627	0.1526	0.1460	0.1263	****	0.9381
Jamundí	0.2787	0.2082	0.2159	0.1680	0.1359	0.1393	0.1025	0.0639	****

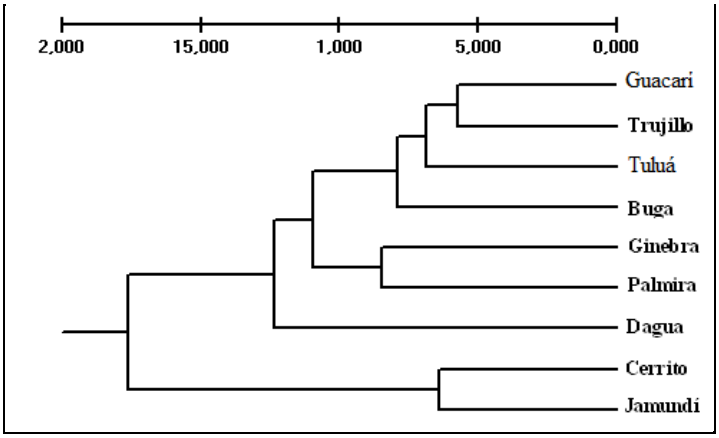


Figura 15. Árbol de distancia de Nei (1978) basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li y el método UPGMA mediante el programa estadístico POPGEN para aislamiento de *Colletotrichum* spp. provenientes de nueve municipios usando microsatélites RAMS.

Mediante cebadores especie específicos y SSCP, se identificaron las especies *C. gloeosporioides* (81%) y *C. acutatum* (19%) como asociados a las poblaciones del agente causante de la antracnosis en la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) del Valle del Cauca. Estudios preliminares realizados por Saldarriaga (2005) reportan la especie *C. acutatum* como el agente causante de la antracnosis en mora, mientras que Forero de la Rotta et al (2002) reportan la especie *C. gloeosporioides* como la causante de la enfermedad. De igual manera Cedeño et al. (1992), en estudios realizados en Venezuela sobre la caracterización morfológica y patogénica de los aislamientos de *Colletotrichum* spp., aislados de mora Castilla,

comprobó que la enfermedad es provocada por el hongo *C. gloeosporioides*. Sin embargo no se han reportado estudios donde se encuentren ambas especies asociados a plantaciones de mora.

La técnica de cebadores especie específicos y la de electroforesis SSCP, constituyeron una herramienta útil para la identificación de las especies del patógeno. La técnica SSCP permitió confirmar los resultados obtenidos mediante el empleo de los cebadores específicos, y aunque requiere de un mayor tiempo de ejecución, también permitió determinar la especie (*C. gloeosporioides*) a la cual pertenece el aislamiento GuL-79C1 el cual no logró ser identificado mediante el empleo de cebadores especie específicos.

Las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se separaron también de acuerdo al nivel de patogenicidad, siendo la especie *C. acutatum* menos patogénica que la especie *C. gloeosporioides.* En dos casos particulares en los que se aisló *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* de la misma lesión*, C. acutatum* presentó baja patogenicidad, mientras que *C. gloeosporioides* mostró un nivel de patogenicidad intermedio. También es probable que *C. acutatum* presente un nivel de patogenicidad bajo frente al ecotipo Castilla intermedio en el que fue inoculado y se halla especializado en atacar otro tipo de clones, donde si es patogénico, por lo que se sugiere realizar pruebas de virulencia con los aislamientos obtenidos frente a los diferentes materiales de mora del Valle.

En el caso de *C. acutatum* aislado de mora, se podría pensar que esta especie es patógena en especies vegetales diferentes, en las cuales podría mostrar niveles mayores de patogenicidad a los reportados en este cultivo, lo que podría indicar que *C. acutatum* es un hospedero transitorio de la mora en espera de hospederos susceptibles.

El 91% de los aislamientos de *C. gloeosporioides* mostró niveles de patogenicidad intermedio y muy alto, mientras que el 9% fue de baja patogenicidad, lo cual puede deberse a variaciones genéticas del patógeno y/o resistencia parcial del genotipo de mora.

Los aislamientos de *Colletotrichum* spp., provenientes de los ecotipos Castilla y Hartona Blanca del municipio de Ginebra, resultaron ser de baja patogenicidad y no patogénicos, lo que podría deberse a que ambos ecotipos están relacionados con resistencia a la enfermedad, sin embargo se hace necesario realizar un estudio de caracterización del germoplasma de mora para establecer las reales diferencias genotípicas de ambos ecotipos.

En el Valle del Cauca existe una gran diversidad de ecotipos de mora, siendo en este estudio predominantes los ecotipos Castilla y Hartona, y encontrándose en menor proporción: Hartona Blanca, Hartona Negra, Regional y Ranchona, los cuales podrían responder a variaciones dentro de la misma Castilla o ser genotipos diferentes que por sus características agronómicas de baja productividad o calidad de la fruta, no han sido adoptados completamente por los

agricultores. Sin embargo, observaciones del comportamiento de estos últimos ecotipos frente a la antracnosis en campo, indican un aparente nivel de resistencia a la enfermedad, información que debe ser confirmada y aprovechada para estudios posteriores, con el fin de identificar fuentes de resistencia a la antracnosis en mora de Castilla.

En el análisis de varianza molecular se obtuvo una variación entre los municipios (poblaciones geográficas) del 19.18% y dentro de los municipios del 80.82%. El valor de Fst 0.192 ($P<0.001$) indicó una gran estructuración genética (Wright 1978) entre los municipios en las plantaciones de mora del Valle del Cauca. Los estudios en fresa de Ureña-Padilla et al (2002) también hallaron valores de Fst muy cercanos al encontrado en mora de 0.15 ($P\leq0.05$).

A pesar de la gran diferenciación genética entre los municipios, no se descarta la existencia de flujo genético sin efecto influyente sobre la estructura poblacional, ya que no todos los aislamientos de un mismo municipio se agruparon, siendo probablemente uno de los factores la diseminación del patógeno debida al intercambio de material de propagación de mora entre los agricultores.

2.1.4.5. Conclusiones

- Se encontraron dos especies de *Colletotrichum* spp. asociados a los cultivos de mora del Valle del Cauca, los cuales corresponden a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.
- La técnica SSCP confirman los resultados obtenidos mediante el empleo de cebadores especie-específicos, indicando que es una poderosa herramienta para distinguir la especie *C. acutatum* de *C. gloeosporioides.*
- El método de inoculación implementado en laboratorio, con pequeñas cámaras húmedas resultó ser muy útil y efectivo para determinar el nivel de patogenicidad de los aislamientos.
- El 91% de los aislamientos de *C. gloeosporioides* mostró niveles de patogenicidad intermedio y alto, mientras que el 100% de los aislamientos de *C. acutatum* mostraron un nivel de patogenicidad bajo y no patogénico.
- El municipio de Buga presentó la mayor cantidad de aislamientos con patogenicidad muy alta, mientras que el municipio de Ginebra mostró la mayor cantidad de aislamientos poco patogénicos.
- Los microsatélites RAMS son apropiados para detectar y medir relaciones genéticas y variaciones entre y dentro las poblaciones de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*.
- Existe una falta de correlación entre los microsatélites RAMS y los niveles de patogenicidad en *Colletotrichum* spp., debido a que estos marcadores moleculares muestrean teóricamente todo el genoma del hongo, y no necesariamente encierran los genes de patogenicidad.
- La diversidad genética total (0.3094 ± 0.0268) para los aislamientos colectados en el Valle del Cauca sugieren que las poblaciones tienen una distribución genotípica heterogénea.

- La diversidad genética total para *C. gloeosporioides* en los cultivos de mora del Valle del Cauca fue de 0.2760±0.0336, la cual es considerada alta en comparación con otros estudios.
- El hecho que la especie *C. acutatum* haya presentado niveles de patogenicidad bajos es relativamente de gran importancia debido a la alta diversidad encontrada, ya que esto haría más difícil el manejo de la antracnosis en el cultivo.
- El valor de Fst (0.192; (P<0.001) indicó una gran estructuración genética entre los diferentes municipios evaluados en las plantaciones de mora del Valle del Cauca.
- Este estudio es un primer avance para lograr el manejo integrado de los agentes causales de la antracnosis en cultivos de mora del Valle del Cauca.

2.1.4.6. Bibliografía

ABANG, M. M., S. WINTER., K. R. GREEN., P. HOFFMANN., H. D. MIGNOUNA & G. A. WOLF. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose in Nigeria. Plant Pathology 51: 63–71.

AFANADOR, L., D. MINZ., M. MAYMON & S. FREEMAN. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Phytopathology 93(5):579-587.

PERFECT, S. E., H. B. HUGHES., R. J. O'CONNELL & J. R. GREEN. 1999. *Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. Fungal Genetics and Biology 27: 186–198.

SUTTON, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. p1-26. en: Bailey J.A & Jeger M.J (eds). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control: CAB International, Wallingford, England.

SWART-MERCIA, G. 1999. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Tesis Postgrado. Pretoria, Universidad de Pretoria, Facultad de Biología y Ciencias Agrícolas.p142-172.

2.1.5. Antracnosis de la mora de Castilla (R*ubus Glau*cus Benth): Variabilidad en especies y razas del agente causante e identificación de fuentes de resistencia a la enfermedad[7].

Objetivo del Proyecto (2): *Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia*

2.1.5.1. Objetivo General

Buscar fuentes de resistencia a *Colletotrichum* spp. en germoplasma colombiano de *Rubus* spp. y genes análogos de resistencia a enfermedades (RGAs)

[7] Lucia Afanador Kafuri, Elizabeth Álvarez, Alonso González

asociados con ésta, con base en la caracterización molecular del germoplasma y la evaluación de la variabilidad existente en las poblaciones del patógeno.

2.1.5.2. Marco Referencial

La Antracnosis es una enfermedad que se encuentra presente en todas las regiones productoras de mora de Castilla de Colombia, con incidencias que van del 50 al 73%. Dada la importancia de esta enfermedad en las principales zonas productoras de mora en el país, se hace necesario iniciar estudios encaminados a un mayor conocimiento de sus agentes causales, y del comportamiento del germoplasma existente frente a las poblaciones del patógeno, aspectos indispensables para la planificación de estrategias adecuadas para su manejo y control en los cultivos de las zonas productoras del país. La identificación correcta y oportuna de los agentes responsables de la Antracnosis de la mora de Castilla y de la variabilidad en sus poblaciones son aspectos indispensables para entender mejor la epidemiología de esta enfermedad y constituyen la base para el desarrollo de programas de mejoramiento genético de esta especie.

2.1.5.3. Metodología

Colecta de cepas de Colletotrichum spp.

Se llevó a cabo en 38 municipios de ocho departamentos productores de mora en Colombia. En cada municipio se visitaron cuatro fincas y en cada una se tomó cuatro muestras de tallos, ramas y/o frutos con síntomas típicos de Antracnosis.

Aislamiento, identificación y almacenamiento del hongo

Los aislamientos monoconidiales del hongo se hicieron en medio PDA. Las colonias fungosas se identificaron de forma preliminar mediante observación al microscopio (aumento de 400X) de estructuras reproductivas tales como acérvulos, masas de esporas, presencia o ausencia del estado sexual, presencia o no de setas y estudio de las características de crecimiento de las colonias en el medio de cultivo. Los cultivos se almacenaron en cuadros de papel filtro colonizados por micelio y esporas del hongo, a una temperatura de 4ºC.

Evaluación de patogenicidad

Se evaluaron 240 aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de tejidos afectados por antracnosis, en cultivos de las zonas seleccionadas para el estudio. Las pruebas de patogenicidad se realizaron siguiendo la metodología descrita por Stewart *et al*., (2003), consistente en cortar porciones de tallo de 20 cm de largo y de 3 a 4 cm de diámetro. A cada tallo se le sellaron los dos extremos con parafina y luego se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% por 5 min., seguido de dos enjuagues en agua de la llave y un enjuague final con agua deionizada. Los tallos lavados se dejaron secar al aire y luego se almacenaron en un cuarto frío a una temperatura de 10ºC.

La inoculación de cada tallo se realizó mediante una herida en la parte central del mismo, con la ayuda de un bisturí. En el interior de ésta se introdujo un disco de agar con micelio del hongo y luego se selló la herida con papel Parafilm® para asegurar el inoculo en su sitio y evitar la pérdida de humedad. Como inoculo se utilizó un aislamiento monoconidial del hongo, de 12 días de edad crecido en medio de cultivo PDA. Como control se utilizaron tallos inoculados con un bloque de agar agua. Los tallos inoculados fueron incubados en cajas plásticas con tapa provistas con una rejilla plástica en la base y 50 ml de agua demonizada para proporcionar condiciones de humedad en el interior de la misma. La incubación se realizó bajo condiciones controladas de cuarto de crecimiento con 8 horas de luz y 16 de oscuridad y una temperatura de 22 a 24ºC (Figura 44)

Figura 44. Metodología de evaluación de patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de mora en tallos desprendidos y bajo condiciones de cuarto de crecimiento.

La evaluación de la respuesta de cada tejido a la inoculación con el hongo se hizo cada cinco días hasta el día 20 después de la inoculación. En cada tallo se midió el ancho y largo de la lesión desarrollada en la zona de inoculación, considerando ésta como una elipse y su relación con respecto al área total del tallo inoculado, para lo cual se midió el largo y contorno del mismo. Los datos generados fueron utilizados para calcular el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) y un ANOVA para establecer diferencias entre los aislamientos evaluados. La información se analizó mediante un diseño experimental de Bloques completos al azar, utilizando el paquete estadístico SAS. Para evaluar la diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba LSD ($\alpha \leq 0.05$).

***Caracterización molecular de cepas de Colletotrichum* spp.**

Para la extracción de ADN cada aislamiento fue crecido en medio líquido caldo de papa más dextrosa (200 g de papa, 20 gr de dextrosa por 1 L de agua destilada) por un tiempo de 10 días bajo condiciones de oscuridad y sin agitación. El micelio fue cosechado al vacío y luego se liofilizó por 24 horas. La extracción se realizó a partir de micelio macerado con nitrógeno líquido, utilizando una cantidad equivalente en volumen a 100µl.

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio macerado siguiendo la metodología descrita por Maluku (2004) con modificaciones de Álvarez *et al*. (2004). La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se cuantificó mediante fluorometría en un Fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200.

Identificación de especie con cebadores especie específicos

Se evaluaron 240 muestras de ADN obtenidas a partir de 240 aislamientos de *Colletotrichum* spp. La identificación molecular de las especies de *Colletotrichum* se realizó mediante amplificación por PCR de regiones específicas del ADN ribosomal del hongo, empleando para ello el cebador universal ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) en combinación con los cebadores especie específicos para *C. gloeosporioides* (CgInt) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG), *C. acutatum* (CaInt2) (GGGGAGCCTCTCGCGG) y *C. boninense* (GCCGTCCCCTGAAAAG). Adicionalmente, se emplearon tres cepas referencia de las especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, como grupo externo se utilizó una cepa del hongo *Pyricularia oryzae.* La composición de la reacción de amplificación es indicada en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición de la reacción para amplificación por PCR de ADN de *Colletotrichum* spp. mediante cebadores especie específicos y micro satélites.

Componente reacción	Volumen
Agua HPLC	18.03 µl
Buffer 10x	2.5
dNTPs (2.5 mM)	2.5
Magnesio (50 mM)	0.75
Cebador (c/u) (50 µM)	0.2
Enzima (5U/ µl)	0.02
ADN (5 ng/ µl)	1
Volumen final	**25 µl**

La amplificación del ADN de cada aislamiento se realizó en un termociclador PTC-100 de MJ Research, utilizando el siguiente perfil: un ciclo inicial de denaturación a 95ºC por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95ºC por 30 segundos, 60ºC por 30 segundos, 72ºC por 1 minuto y una extension final a 72ºC por 5 minutos. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

Evaluación de la diversidad genética de las especies Colletotrichum

La diversidad intra y entre especies de las poblaciones de *Colletotrichum* representativas de las ocho zonas productoras de mora, se determinó mediante el empleo de cebadores Ap-PCR derivados de secuencias micro satélite: cebadores $(GACA)_4$, $(GACAC)_3$, $(AGG)_5$, MR, $(TCC)_5$, y mediante el análisis de las regiones del ADN ricas en A y T.

Para la amplificación por PCR se utilizó la misma composición de la reacción utilizada en la identificación de especies mediante cebadores especie específicos (Tabla 12). El perfil de amplificación utilizado consistió en: un ciclo inicial de denaturación a 95ºC por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95ºC por 30 s, 60ºC por 30 s, 72ºC por 1 min y 30 s; y una extension final a 72ºC por 5 min.

Para el análisis mediante regiones del ADN ricas en A y T, se realizó la digestion de 500 ng de ADN total de cada aislamiento del hongo con 0.5 unidades de la enzima HaeIII, más 4 µl de RNAsa. La reacción luego se incubó a 37ºC por 16 horas y los fragmentos producto de la digestion se separaron en un gel de agarosa al 1.8%% en buffer TAE y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio; la imagen obtenida se capturó utilizando un lector de geles Gel Doc 2000 (BioRad).

Con el fin de analizar los resultados obtenidos de forma global, se realizó un análisis de Coordenadas Principales con los datos combinados de los cinco marcadores microsatélites, utilizando el programa SAS.

El análisis de los datos de regiones ricas en A y T se llevó a cabo con el paquete estadístico NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System), versión 2.0, mediante organización de los datos en una matriz binaria, asignándole el numero 0 a la ausencia de banda y 1 a la presencia de ésta. Posteriormente, se generó una matriz de similitud mediante el empleo del coeficiente de Coincidencia Simple; seguido de un análisis por el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted pairgroup method using arithmetic average), y gráficamente se evaluó por medio de la generación de un dendograma.

Caracterización de germoplasma de mora de Castilla

Multiplicación de germoplasma de Rubus spp.

El germoplasma de mora de Castilla con fines de caracterización se multiplico bajo condiciones in Vitro y luego es establecido bajo condiciones de casa de malla en CIAT, Palmira. Cada planta se sembró de forma individual en un matero plástico de 6” con un sustrato compuesto por capote o suelo de vivero, suelo CIAT y arena en una proporción 4:1:1 respectivamente.

Evaluación de germoplasma de Rubus spp. por su resistencia a la antracnosis

Se evaluó la respuesta de 58 accesiones de *Rubus* spp. a la antracnosis mediante la inoculación artificial con 16 aislamientos de *Colletotrichum spp.*. El grupo de accesiones evaluado está compuesto por: 43 accesiones pertenecientes a la colección colombiana de *Rubus spp*. manejada por Corpoica, 12 genotipos colectados en las zonas de estudio, un clon comercial y dos genotipos pertenecientes a la colección de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. El pasaporte de cada genotipo es presentado en el Anexo 1.

La metodología de inoculación utilizada fue la de Stewart *et al*., (2003) modificada para planta completa. Se inocularon plantas de cuatro meses de edad y crecidas bajo condiciones de casa de malla. A cada planta se le realizó una herida pequeña en la parte media del tallo, luego sobre la herida se depositó un disco de agar con micelio del hongo de 10 días de edad y finalmente se cubrió con una cinta de Parafilm®. Las plantas inoculadas se incubaron durante cinco días en una cámara húmeda, después de este tiempo se llevaron a un invernadero donde permanecieron 20 días más. La respuesta de cada genotipo a la enfermedad se determinó a partir del día 10 después de la inoculación y cada cinco días hasta el día 25. La resistencia o susceptibilidad de la planta a la enfermedad se determinó mediante el empleo de una escala de severidad de 1 a 6, diseñada mediante la combinación de síntomas presentados por la planta, tales como desarrollo de callo en el sitio de la inoculación (Grado 1) hasta muerte completa de la planta o rama (Grado 6) (Figura 45). Las plantas con grados 1 a 2 fueron consideradas como resistentes (R), aquellas con grados 3 a 4 como intermedias (I) y las que presentaron grados 5 a 6 como susceptibles (S).

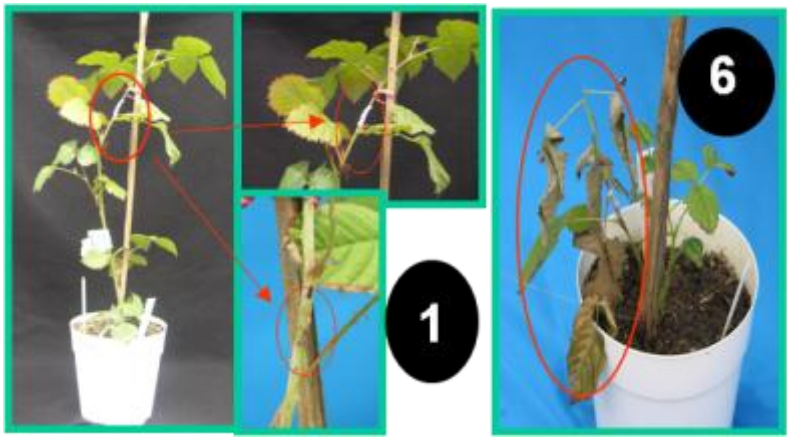


Figura 45. Escala de severidad para la evaluación de resistencia a la antracnosis en germoplasma de mora de Castilla: Grado 1 planta resistente, Grado 6 planta susceptible.

Los datos generados fueron utilizados para calcular el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) y un ANOVA para establecer diferencias entre los genotipos evaluados.

Caracterización molecular de germoplasma de Rubus spp. mediante micro satélites (RAMS)

La variabilidad genética del germoplasma de *Rubus* spp. se determinó mediante la técnica de amplificación al azar de micro satélites RAMS. Se evaluaron los cebadores CCA, CGA, GT, AG, CT, TG, ACA y CA en 66 accesiones de *Rubus* spp., 43 de ellas pertenecientes al Banco de Germoplasma de Corpoica.

La amplificación del ADN de cada genotipo se realizó en un termociclador PTC-100 de MJ Research, utilizando un perfil de amplificación específico para cada cebador (Tabla 2). La reacción de PCR fue de un volumen final de 12.5 µl y

estuvo compuesta de buffer Taq a una concentración de 1X M/µl, 0.22 mM de dNTPs, 0.65 µM del cebador, 2.2 mM de $MgCl_2$, 1 µl de 5ng/µl de ADN, agua ultra pura grado HPLC y 0.06 U/µl de taq polimerasa. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio; la imagen obtenida se capturó utilizando un lector de geles Gel Doc 2000 (BioRad).

El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico NTSYS-PC (Numerical Taxonomía and Multivariate Analysis System), versión 2.0, para lo cual, éstos se organizaron en una matriz binaria, asignándole el numero 0 a la ausencia de banda y 1 a la presencia de ésta. Posteriormente, se generó una matriz de similitud mediante el empleo del coeficiente de Coincidencia Simple (SM); la cual se analizó por el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted pairgroup method using arithmetic average), y gráficamente se evaluó por medio de la generación de un dendograma.

Tabla 12. Perfiles de amplificación empleados para la amplificación de ADN de *Rubus* spp. mediante el empleo de cebadores micro satélites (RAMS).

Etapas amplificación	Condiciones de amplificación para cada cebador					
	ACA	**CT**	**CA-AG**	**CGA**	**CCA-TG**	**GT**
1	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min	95°C 5min
2	95°C1min	95°C 40s	95°C 40s	95°C 40s	95°C 40s	95°C 30s
3	49°C 45s	41°C 45s	50°C 45s	61°C 45s	55°C 45s	58°C 45s
4	72°C 3min	72°C 2min	72°C 2min	72°C 4min	72°C 2min	72°C 2min
5	35 ciclos desde 2	35 ciclos desde 2	35 ciclos desde 2	37 ciclos desde 2	35 ciclos desde 2	35 ciclos desde 2
6	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 10min	72°C 7min
7	10°C 30min	10°C 30min	10°C 30min	10°C 30min	10°C 30min	10°C 30min

2.1.5.4. Resultados y Discusión

Colecta aislamiento y conservación de cepas de Colletotrichum spp.

Se realizaron colectas del hongo en 38 municipios y 156 fincas de los ocho departamentos productores de mora: Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Huila, Quindío, Risaralda, Santander y Valle del Cauca. Se conformó un cepario de 458 aislamientos de *Colletotrichum* spp., el cual hace parte de la Colección de Hongos fitopatógenos del Laboratorio de Patología de frutas del CIAT, Palmira.

Las características morfológicas de los aislamientos obtenidos indicaron la presencia de dos especies de *Colletotrichum* asociadas con la antracnosis en mora de Castilla en Colombia, las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, Las colonias tienden a tener una coloración gris a gris oliva con tonalidades claras a

oscuras, especialmente en aquellas cepas con una tipología propia de *C. gloeosporioides* (Figura 46A parte superior). En aislamientos con tipología propia de *C. acutatum*, la colonia tiende a presentar una coloración blanca a gris claro (Figura 46A parte inferior).

La mayoría de los aislamientos no presenta esporulación evidente, ésta se observa principalmente en aquellos aislamientos con tipología de *C.acutatum*, en los cuales la esporulación tiende a ser de dos tipos: central o distribuida en toda la colonia y de color amarillo rojizo o amarillo pálido. En varios de los aislamientos pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* se encontró la fase sexual en medio de cultivo, presente como estructuras de color café oscuro o negro inmersas en la colonia, de consistencia compacta y resistentes al rompimiento, las cuales correspondieron a peritecios típicos del teleomorfo *Glomerella cingulata* (Figura 46B y 46C).

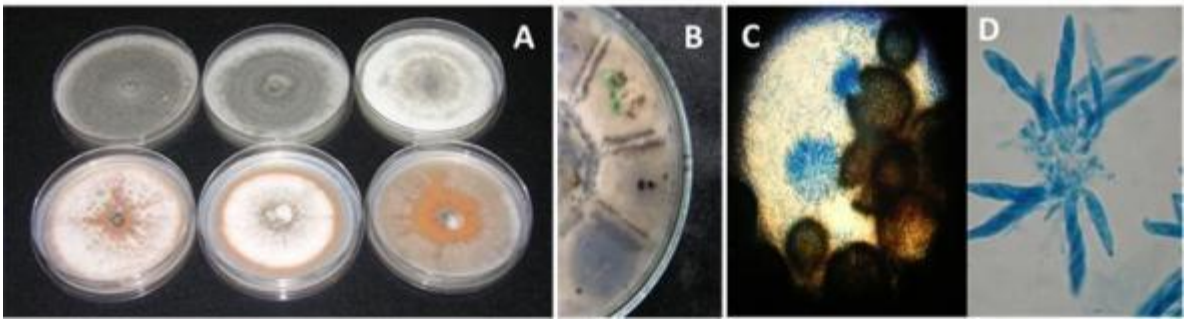


Figura 46. Características morfológicas de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de mora. A: colonias monoconidiales de *C. gloeosporioides* (parte superior) y *C. acutatum* (parte inferior); B: peritecios inmersos en medio de cultivo, C y D: peritecios, ascas y ascosporas de *Glomerella cingulata*.

La mayoría de los aislamientos evaluados se caracterizaron por presentar conidias de forma oblonga - elíptica, sin embargo también se observaron esporas elíptico-fusiformes y elípticas (Figura 47).

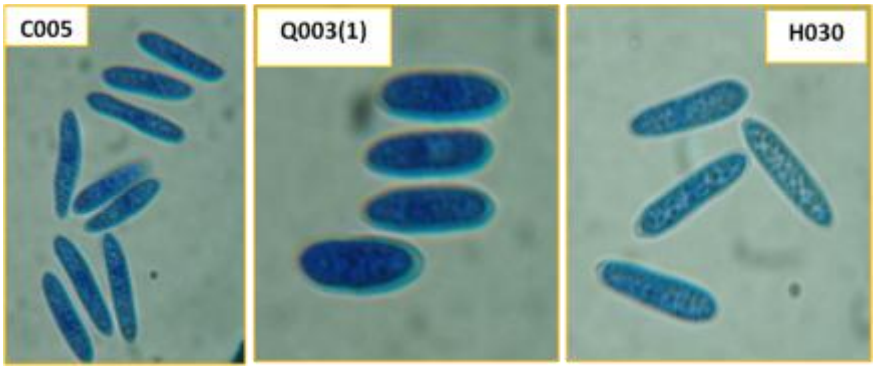


Figura 47. Características morfológicas de esporas de *Colletotrichum spp*. de mora de Castilla (100X). cepa C005: elíptica- fusiforme, cepa Q003 (1): oblonga – elíptica y cepa H030: elíptica.

Es importante resaltar que los criterios morfológicos utilizados para la diferenciación de especies de *Colletotrichum* son excesivamente variables. Sin

embargo, algunos autores distinguen las especies de este género con base en algunos caracteres como el tamaño y forma de las conidias y apresorios. Sutton (1980) y Bailey & Jeger (1992) describen las conidias de *C. gloeosporioides* con ápices obtusos y de tamaño variable entre 12.0-17.0 x 3.5-6.0 µm, y los apresorios como clavados o irregulares y algunas veces compuestos (6.0-20.0 x 4.0-12.0µm).

A diferencia de *C. gloeosporioides, C. acutatum* se caracteriza por presentar conidias rectas, fusiformes y con extremos agudos (8.0-16.5 x 2.5-4.0µm). Los apresorios formados por este especie son oscuros, clavados, ovalados, obovados o irregulares, con márgenes enteras o estrechamente lobuladas (8.5-10 x 4.5-6µm) (Bailey & Jeger 1992, Arx 1970).

Por su parte, *C. boninense* se caracteriza por presentar apresorios oscuros, con bordes irregulares (6.0-17.0 x 4.0-15.0 µm). Las conidias se forman en masas naranjas, son rectas, cilíndricas y obtusas en los extremos (13-15.5 x 5-6µm) (Moriwaki et al. 2003).

De acuerdo con lo reportado en la literatura acerca de la forma de las conidias de las especies de *Colletotrichum*, el 69.58% de los aislamientos evaluados presentó conidias características de *C. gloeosporioides* y/o *C. boninense.* Las cepas restantes presentaron conidias con uno o los dos ápices agudos, lo cual es considerado como un carácter importante en la descripción morfológica de *C. acutatum.*

Evaluación de patogenicidad

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) mostró diferencias significativas entre localidades (Tabla 13). Se identificaron dos grupos de patogenicidad: uno conformado por los aislamientos provenientes de Caldas y Risaralda (25%) y un segundo conformado por los aislamientos de Antioquia, Cundinamarca, Huila, Quindío, Santander y Valle del Cauca (75%) (Figura 48).

Tabla 13. Agrupamiento de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de mora de Castilla inoculados en tallos de mora con base en ANOVA y Duncan 5%.

Localidad	**Cantidad de aislamientos x Rep.**	**Media ABCPE[1]**	**Agrupamiento[2]**		
Caldas	90	344.20	a		
Risaralda	99	258.96		b	
Huila	90	67.20			c
Cundinamarca	90	61.66			c
Valle del Cauca	90	56.76			c
Quindío	101	45.34			c
Santander	99	44.64			c
Antioquia	91	40.66			c

1=área bajo la curva de progreso de la enfermedad (%/días); 2= Agrupamiento de localidades según patogenicidad de los aislamientos de acuerdo a su origen.

Figura 48. Respuesta de tallos de mora de Castilla a la inoculación artificial con aislamientos de *Colletotrichum* spp.. Izquierda: respuesta al aislamiento A040 de patogenicidad baja; derecha: respuesta al aislamiento AN004b de patogenicidad alta.

De acuerdo a estos resultados los aislamientos provenientes de cultivos de Caldas y Risaralda fueron los más patogénicos, mientras que aquellos de Antioquia, Cundinamarca, Huila, Quindío, Santander y Valle del Cauca presentan niveles de patogenicidad intermedia, baja o muy baja.

En el análisis dentro de localidades, el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) mostró diferencias estadísticamente significativas para los aislamientos provenientes de los departamentos de Antioquia, Quindío, Santander y Valle del Cauca, mientras que en las cinco localidades restantes no se observó diferencias significativas entre aislamientos. Se logró la conformación de máximo tres grupos dentro de cada localidad: uno de patogenicidad alta, otro de intermedia y un tercero de patogenicidad baja a muy baja (Tabla 49).

Figura 49. Nivel de patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de mora de Castilla procedentes de cultivos de los departamentos de Antioquia, Quindío, Santander y Valle del Cauca, según ANAVA para el parámetro Área Bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE).

Localidad	**Nivel de patogenicidad**		
	Alta	**Intermedia**	**Baja**
Antioquia	18[a]	57	25
Quindio	21	18	61
Santander	29	32	39
Valle del Cauca	28	55	17

a = Porcentaje de aislamientos dentro de cada departamento con patogenicidad alta, intermedia y baja

Los aislamientos del departamento de Antioquia y Valle del Cauca tienden a presentar un nivel de patogenicidad intermedia, 57% y 55% respectivamente. El 61% de los aislamientos de Quindío tienden a presentar un nivel de patogenicidad baja; mientras que en Santander, el nivel de patogenicidad entre aislamientos tiende a distribuirse de forma muy similar entre las tres categorías: 39% de patogenicidad baja, 32% con intermedia y 29% con patogenicidad alta.
La tendencia observada en las pruebas de patogenicidad, indica que los aislamientos con mayor patogenicidad (patogenicidad alta e intermedia),

independiente de su zona de origen, pertenecen a la especie *C. gloeosoporioides*, mientras que aquellos de patogenicidad baja a muy baja están asociados con la especie *C. acutatum*. Sin embargo, es importante destacar que las dos especies presentaron una cierta preferencia por ciertos tejidos en la planta, la especie *C. gloeosporioides* se encontró asociada en un mayor grado a lesiones en tallo y *C. acutatum* a lesiones en fruto y botones florarles; lo cual podría explicar la diferencia observada en patogenicidad para las dos especies, dado que la prueba realizada solo permitió evaluar la infección del patógeno en tejido de tallo.

Una tendencia similar se observó con relación a la tasa de crecimiento del hongo, aquellos aislamientos identificados como *C. gloeosporioides* tienden a tener una tasa de crecimiento mayor y una patogenicidad alta a intermedias, mientras que los pertenecientes a la especie *C. acutatum*, en general presentan una tasa menor de crecimiento y niveles bajos de patogenicidad en tallo. La especie *C. acutatum* es un patógeno altamente especializado en el tejido que ataca en cada hospedero, y se la encuentra asociada especialmente con síntomas en flores y frutos. En algunos casos, ataca tejidos jóvenes, mientras que en otros este tipo de tejido puede ser completamente inmune a la infección. Un ejemplo de ello ocurre en cítricos, hospedero en el cual esta especie ataca preferiblemente las flores, sin producir ningún tipo de síntomas en hojas jóvenes. En el caso de manzana, ataca preferiblemente los frutos, sin causar síntomas en las hojas. El patógeno es considerado en sentido amplio cómo hemibiotrofo, ya que posee una fase biotrofa y necrotrofa dependiendo del hospedero y del tejido infectado en un hospedero particular (Pérez et. al, 2005).

Caracterización molecular de cepas de Colletotrichum spp.

Se procesó un total de 240 aislamientos, de los cuales se obtuvo ADN de alta calidad y con rendimientos de 50 a 235 ng/µl (Figura 50).

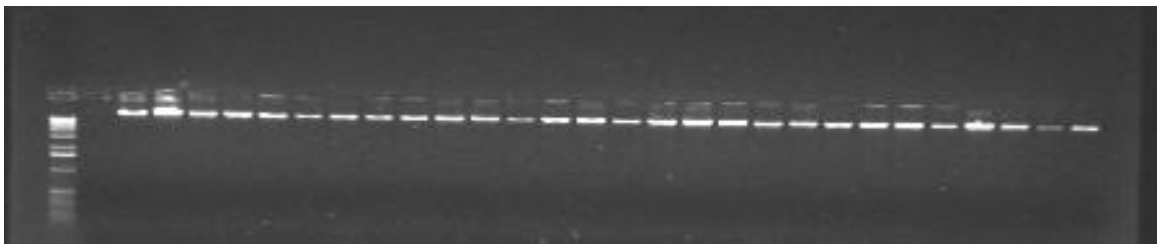


Figura 50. Electroforesis de ADN total de *Colletotrichum* spp. de mora de Castilla en gel de agarosa al 0.8%.

Identificación de especie con cebadores especie específicos

Los resultados de la identificación molecular de los aislamientos indican a la especie *C. gloesporioides* (67%) como la más predominante, seguida de *C. acutatum* (32%) y en forma muy incipiente *C. boninense* (1%). La especie *C. gloeosporioides* se encontró principalmente en los departamentos de Valle, Antioquia, Cundinamarca, Huila y Santander. La especie *C. acutatum* predominó

en la zona cafetera, departamentos de Caldas, Quindío y Risaralda, mientras que *C. boninense* solo se encontró en Risaralda.

El cebador taxón-específico *Ca*Int2 en combinación con el ITS4 amplificó un fragmento de ADN de 490-pb para el 32% de los aislamientos evaluados y el aislamiento referencia de *C. acutatum* Tom-21. Para el 68% restante no se obtuvo amplificación (Figura 51a). El cebador especie-específico *Cg*Int utilizado en combinación con el ITS4 amplificó un fragmento de ADN de 450-pb para el 67% de los aislamientos y la cepa referencia de *C. gloeosporioides* GND-1; para el 33% restante no se obtuvo amplificación (Figura 51b).

En el caso del cebador *Col*1 utilizado en combinación con ITS4, sólo se obtuvo producto de amplificación con el ADN de los aislamiento R001 y R033 de Risaralda (1%) y para la cepa referencia de *C. boninense* Pass-52; dando como resultado un fragmento de 520-pb (Figura 51c).

Los aislamientos identificados molecularmente como pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* tienden a presentar tasas de crecimiento alta e intermedia, mientras que aquellas identificadas como *C. acutatum* presentan tasas de crecimiento baja o muy bajas. Una tendencia muy similar fue observada en las pruebas de patogenicidad, en la cual los aislamientos con mayor patogenicidad (patogenicidad alta e intermedia), independiente de su zona de origen, pertenecen a la especie *C. gloeosoporioides*, mientras que aquellos de patogenicidad baja a muy baja están asociados con la especie *C. acutatum*.

Los resultados obtenidos indican la presencia simultánea de tres especies de *Colletotrichum* en mora de Castilla; *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*; las cuales al parecer están asociadas con órganos diferentes en la planta: tallos, frutos y botones florales; algo ya observado en otros frutales y especies de plantas, especialmente en relación a *C. acutatum*. (Pérez et. al, 2005; Adaskaveg y Forster, 2000; Adaskaveg y Hartin, 1997; Forster y Adaskaveg, 1999).

La presencia simultánea de estas tres especies en mora podría tener implicaciones desde el punto de vista epidemiológico y por consiguiente en el manejo de la enfermedad, especialmente en lo relacionado con el control químico, teniendo en cuenta que ya existen reportes en los cuales se indica especialmente una respuesta diferencial de las especies *C. gloeosoporioides* y *C. acutatum* a la acción de ciertos fungicidas, especialmente del tipo de los Benzimidazoles (Adaskaveg y Hartin, 1997; Bernstein et. al, 1995; Freeman et. al, 1998; Pérez et. al, 2004).

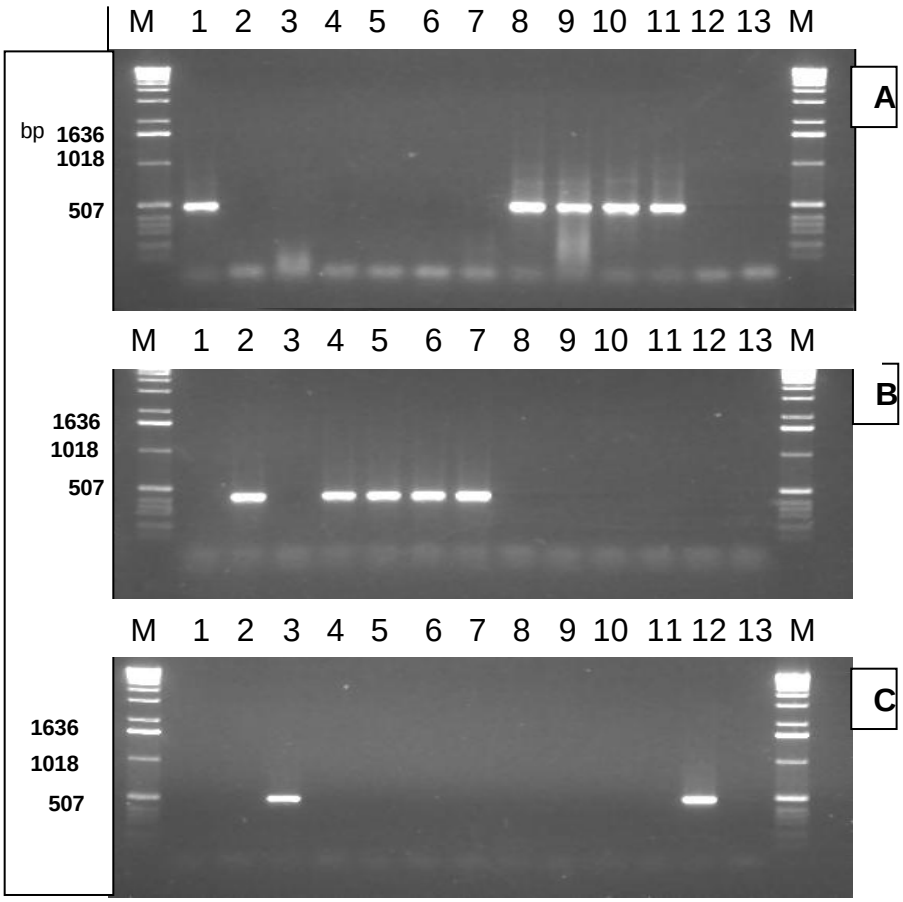


Figura 51. Identificación taxa-específica de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense* con base en la región ITS del ADNr. M: marcador de peso molecular 1 Kb; 1 a 3: aislamientos referencia para las especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*, respectivamente; 4 a 12 aislamientos de Colletotrichum de mora; 13 control negativo.

Análisis de diversidad de especies de Colletotrichum mediante marcadores ISSR

Se evaluaron ocho cebadores Ap-PCR, los cuales mostraron una diversidad moderada dentro de las dos especies de Colletotrichum registradas como las más importantes para mora de Castilla en Colombia.

La evaluación de diversidad intra y entre especies de *Colletotrichum* de mora de Castilla confirmó la separación de las poblaciones del hongo en tres especies diferentes, las que a su vez se distribuyen en seis grupos genéticos (Figura 52). Los aislamientos pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* se encuentran en su mayoría ubicados en el Grupo 1 (82%) y el Grupo 2 (14%) con muy poca representación en los grupos restantes. Los aislamientos pertenecientes a la especie *C. acutatum* se encuentran principalmente presentes en los grupos genéticos 4 (44%) y 5 (47%) con poca representación en los grupos 3, 6 y ninguna en el grupo 2. Los aislamientos de la especie *C. boninense* se ubicaron en el grupo genético 6 junto a otros aislamientos de las otras dos especies identificadas.

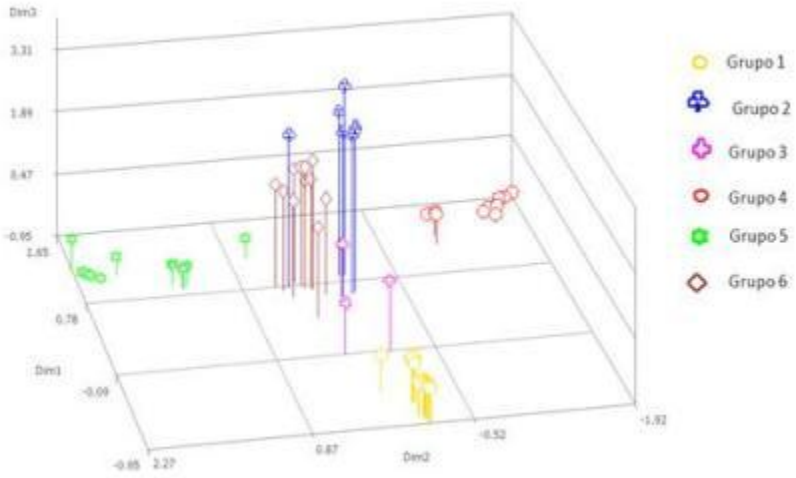


Figura 52. Gráfico de dispersión en 3D del análisis de Correspondencia Múltiple para 240 aislamientos colombianos de *Colletotrichum* spp. de mora de Castilla con base en un análisis con cebadores Ap-PCR derivados de micro satélites.

El análisis por zona geográfica, mostró una mayor diversidad en aislamientos provenientes de Risaralda y Santander, intermedia en aislamientos de Huila, Caldas, Quindío, Valle y Cundinamarca; y la más baja se encontró en aislamientos provenientes del departamento de Antioquia.

Estos resultados indican una mayor diversidad genética para la especie *C. acutatum* y moderada a baja para *C. gloeosporioides*. La baja diversidad encontrada en la especie *C. gloeosporioides*, indica la presencia de un mecanismo de reproducción de tipo asexual predominante en las poblaciones analizadas, lo que ha conllevado a la existencia de una población clonal, que se ha diseminado por medio de semilla vegetativa del hospedero a través de todas las zonas productoras de mora en Colombia, lo que explicaría la presencia en todas las regiones evaluadas de un grupo genético común.

Aunque, la fase sexual de C. gloeosporioides fue detectada en campo y laboratorio, ésta parece no jugar un papel importante como mecanismo de variación genética para esta especie en mora de Castilla, ni tampoco en su diseminación bajo condiciones de campo.

La presencia simultánea de ambos mecanismos de reproducción en *C. gloesporioides* de mora de Castilla, hacen de éste un patógeno más exitoso y con mayor capacidad de adaptación a condiciones ambientales diferentes.

Análisis de diversidad mediante regiones de ADN ricas en A+T

La evaluación de diversidad intra y entre especies de *Colletotrichum* de mora de Castilla mediante el análisis de regiones del ADN ricas en A+T dio como resultado la conformación de cinco grupos genéticos, en los cuales se distribuyen las tres

especies del hongo previamente identificadas (Figura 53). El Grupo I conformado por 141 aislamientos (59%), Grupo II por 44 aislamientos (18.5%), Grupo III por 21 (9%), Grupo IV por 32 aislamientos (13%) y el Grupo V por tres aislamientos (0.5%).

Los aislamientos pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* se encuentran ubicados en su mayoría en el Grupo I (87%) y en una menor proporción en el Grupo III (13%). Los aislamientos de la especie *C. acutatum* se ubicaron en los grupos genéticos II (58%) y IV (42%). El único aislamiento analizado de la especie *C. boninense* se ubicó en el Grupo genético V junto con el aislamiento referencia de la especie *C. acutatum*. La similitud de los aislamientos dentro de cada grupo fue del 100%. La similitud entre los grupos de la especie *C. gloeosporioides* fue del 54% y entre los de la especie *C. acutatum* del 64%.

La similitud entre las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* fue mayor (67%) entre los aislamientos pertenecientes a los Grupos II y IV, que entre los de los Grupos I y II (55%). El aislamiento de la especie *C. boninense* presento una mayor similitud con los aislamientos de la especie *C. acutatum* (72% y 78%) que con aquellos de la especie *C. gloeosporioides* (64% y 71%).

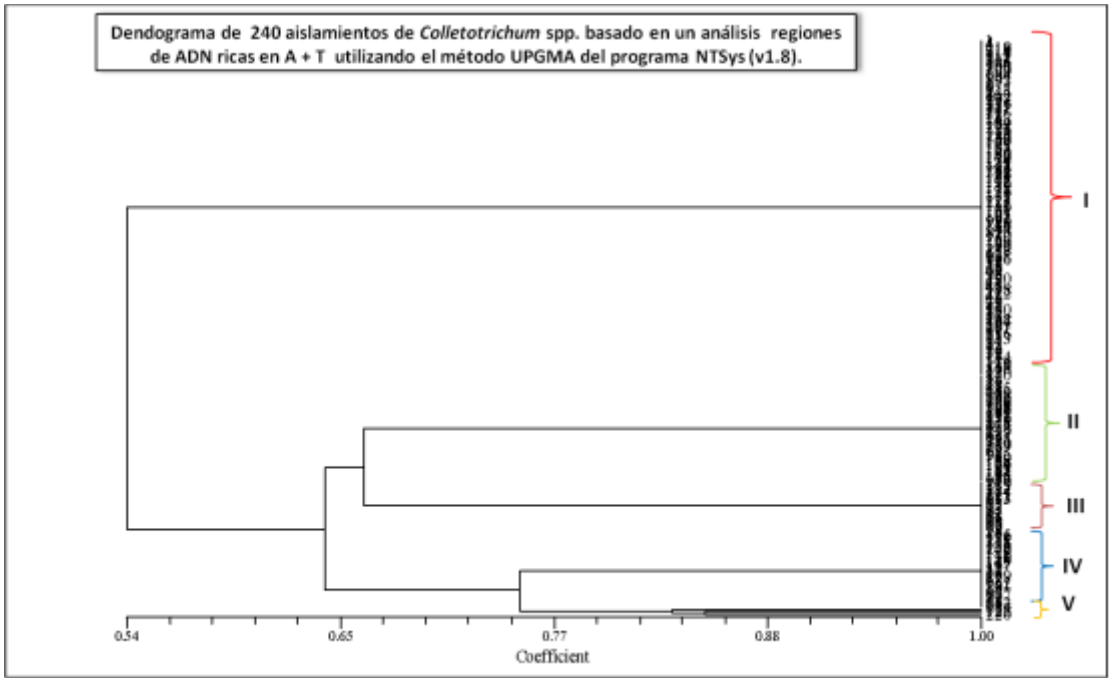


Figura 53. Dendograma de 240 aislamientos de *Colletotrichum* spp. basado en un análisis de regiones de ADN ricas en A+T, utilizando el método UPGMA del programa NTSys (v.1.8)

Caracterización molecular de germoplasma de Rubus spp. mediante micro satélites (RAMS)

El análisis de diversidad del germoplasma de *Rubus* spp. mediante marcadores RAMs permitió agrupar las 66 accesiones en seis grupos genéticos (Figura 10): Grupo I integrado por 61 de las accesiones, grupo II, III y IV por una accesión cada uno y grupo VI por las accesiones ILS2377 e IVC024. Las accesiones

pertenecientes al Grupo I presentan una similitud entre ellas del 100% y con el resto de la población del 60%. Las accesiones ILS2377 e IVC024 presentaron una similitud entre ellas del 88% y con el resto de la población del 63%. Estos resultados indican que la población de *Rubus* spp. analizada es genéticamente homogénea con una porción muy pequeña de individuos genéticamente diferentes.

Los microsatélites RAMS mostraron muy baja diversidad dentro del germoplasma colombiana de *Rubus* spp., conformado en su gran mayoría por mora de Castilla perteneciente a la especie *Rubus glaucus* y unos pocos representantes de especies silvestres e introducidas. El 8% de las accesiones mostraron polimorfismo, mientras que el 98% fueron monomórficas para los ocho cebadores evaluados (Figura 54). Las accesiones polimórficas corresponden a especies silvestres e introducidas en su mayoría, las cuales podrían pertenecer a *R. urticifolius, R. robustus* y *R. idaeus* (datos no confirmados).

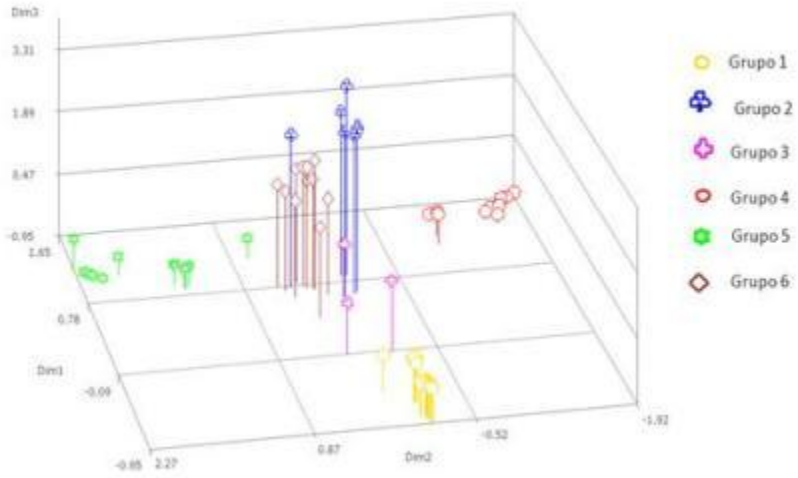


Figura 54. Dendograma de 66 accesiones de *Rubus spp*. basado en un análisis con marcadores RAMs utilizando el método UPGMA del programa NTSys (v1.8).

Evaluación de germoplasma de Rubus spp. por su resistencia a la antracnosis

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) mostró diferencias significativas entre tratamientos y entre repeticiones (Tabla 14). Se identificaron tres grupos de respuesta a la antracnosis entre los materiales de *Rubus* spp.; un primer grupo de alta susceptibilidad, un segundo de susceptibilidad intermedia y un tercero de genotipos medianamente resistentes y resistentes.

Tabla 14. Análisis de Varianza para ABCPE de 58 genotipos de mora pertenecientes al Banco colombiano de Germoplasma de *Rubus* spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad > F
rep	2	412,154	3,75	0,0239
trat	450	3351,157	30,5	<.0001

Nivel de significancia estadística (α=0.05)

El análisis individual por tratamiento mostró diferencias estadísticamente significativas entre genotipos cuando estos fueron inoculados con las cepas 26(AN034a), 47(C030), 82[S035 (1)], 116(V130), 131(H013), 192(R001), 193(R002b) y 248(CD028), aislamientos pertenecientes a las especies *C. gloeosporioides* y *C. boninense*. La mayor virulencia fue observada para el aislamiento 161 y la menor en el aislamiento 192 correspondiente a la especie *C. boninense* (Tabla 15). El mayor coeficiente de variación (CV) fue observado con el aislamiento 192 (69%) y el más bajo con el aislamiento 116 (8%). Para los ocho tratamientos restantes, todos pertenecientes a la especie *C. acutatum*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre genotipos.

Tabla 15. Media y coeficiente de variación para la respuesta de 58 genotipos de *Rubus* spp. frente a nueve aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en ANOVA (α=0.05)

Tratamiento	Media General	CV
161	62.1379	20.84606
248	60.7222	18.59897
82	59.9393	24.59502
47	59.24359	20.91947
131	58.8046	20.95941
116	58.2222	7.775066
193	57.7011	25.70742
26	47.9151	30.49379
192	8.2858	68.8566

Los genotipos ILS1817, ILS2363, ILS2366, ILS2372 y ILS2377 fueron resistentes a todos los aislamientos evaluados, excepto en el caso del ILS2372 que mostró una reacción intermedia al aislamiento 193. Los 53 genotipos restantes fueron susceptibles o medianamente susceptibles a todos los aislamientos de la especie *C. gloeosporioides* y resistentes a los de la especie *C. acutatum*.

Estos resultados confirman lo encontrado en las pruebas de patogenicidad, en las cuales se observó una mayor virulencia en aislamientos pertenecientes a la especie *C. gloeosporioides* y menor para los de la especie *C. acutatum*. Sin embargo, de nuevo es importante resaltar que al parecer estas diferencias se deben a la preferencia de las dos especies para atacar ciertos tejidos de la planta, lo que no permitiría descartar completamente a la especie *C. acutatum* como importante en la epidemiología de la antracnosis de la mora en Colombia, haciéndose entonces necesario considerar estudios futuros los cuales permitan identificar de forma clara el papel que esta especie está jugando en el desarrollo de la enfermedad.

2.1.5.5. Conclusiones

- Las poblaciones colombianas de *Colletotrichum* spp. agente causante de la antracnosis en mora de Castilla, están conformadas en su mayoría por las especies *C. gloeosporioides* y *C.acutatum* y en un grado no significativo por la especie *C. boninense.*
- Los aislamientos provenientes de zonas productoras de mora en Caldas y Risaralda presentan mayor patogenicidad.
- Dentro de los departamentos de Antioquia, Quindío, Santander y Valle del Cauca se detectó mayor variación patogénica entre los aislamientos. Los aislamientos de los departamentos restantes no presentan diferencias significativas entre ellos.
- Los aislamientos identificados como *C. gloeosporioides* presentan niveles de patogenicidad alta, intermedia y baja; mientras que los de la especie *C. acutatum* tienden a presentar niveles de patogenicidad baja a muy baja.
- La evaluación de diversidad intra y entre especies de *Colletotrichum* de mora de Castilla confirmó la separación de las poblaciones del hongo en tres especies diferentes, las que a su vez se distribuyen en seis grupos genéticos. El análisis por zona geográfica, mostró una mayor diversidad en aislamientos provenientes de Risaralda y Santander, intermedia en aislamientos de Huila, Caldas, Quindío, Valle y Cundinamarca; y la más baja se encontró en aislamientos provenientes del departamento de Antioquia.
- Se identificó una mayor diversidad genética para la especie *C. acutatum* y moderada a baja para *C. gloeosporioides*.
- Los microsatélites RAMS mostraron muy baja diversidad dentro del germoplasma colombiana de *Rubus* spp., conformado en su gran mayoría por mora de Castilla perteneciente a la especie *Rubus glaucus* y unos pocos representantes de especies silvestres e introducidas.
- Se identificó dentro del germoplasma colombiano de *Rubus* spp. cinco genotipos resistentes a la antracnosis y 53 susceptibles a aislamientos representativos de *C. gloesporioides*, la especie más importante causante de esta enfermedad en Colombia.

2.1.5.6. Recomendaciones

Desarrollar una metodología que permita evaluar la respuesta del germoplasma de *Rubus* spp. a la especie *C. acutatum*, de tal manera que se pueda identificar el papel que esta especie está jugando en la epidemiología y desarrollo de la antracnosis de la mora de Castilla en Colombia.

Evaluar germoplasma de *Rubus* spp. perteneciente a especies diferentes a *R. glaucus*, en particular especies silvestres, las cuales pueden representar una fuente importante de genes de resistencia a la antracnosis y otras enfermedades de este cultivo en Colombia.

2.1.5.7. Bibliografía

AFANADOR – KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M. y FREEMAN, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Phytopathology 93:579 – 587.

ÁLVAREZ, E., C. A. OSPINA, J. F. MEJIA y G. A. LLANO. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana 28(1):1-8.

BAILEY, J. A. & M. J. JEGER. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Redwood Press Ltd., CAB International, UK. 388 P.

STEWART, P.J., CLARK, J.R. y FENN, P. 2003. Evaluation of resistance to *Erwinia amylovora* and *Botryosphaeria dothidea* in Eastern U.S. blackberry cultivars. Horticultural Studies, AAES Research Series 520: 32 – 34.

SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute . Kew, UK. 696 P.

2.1.6. Evaluación de alternativas de control biológico de *Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* por antagonismo con *Trichoderma spp*[8].

Objetivo del Proyecto (3): *Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes.*

2.1.6.1. Objetivos

Objetivo General

Evaluar alternativas no convencionales a los agroquímicos para el control de *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, aislados de mora y lulo.

Objetivos Específicos

- Determinar la efectividad antagonista en cultivos duales y filtrados libres, sobre *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum in Vitro*, de seis cepas de *Trichoderma* spp.
- Evaluar y determinar la efectividad de extractos vegetales de *Tagetes patula*, *Swinglea glutinosa*, *Furcraea macrophylla* y Lixiviado de Raquis de Plátano, para el control de *C. gloeosporioides, C. acutatum* y *B. cinerea In Vitro.*
- Realizar pruebas en plantas de mora inoculadas en condiciones de invernadero con *C. gloeosporioides* aislado de mora utilizando las alternativas más efectivas identificadas *In Vitro*, en el control de este patógeno.

[8] Arango, Lina.

2.1.6.2. Marco Referencial

El moho gris o pudrición del fruto causado por *Botrytis cinerea* Pers, es considerada una de las enfermedades más comunes y serias del género *Rubus* y de otros pequeños frutos como fresas, uvas, frambuesa a nivel mundial (Molina et al. 2004). Tamayo & Peláez (2000) reportaron pérdidas de frutos de mora entre 50% y 76% en Colombia, a causa de esta enfermedad.

El control químico para el manejo de estas enfermedades requiere aplicaciones frecuentes de fungicidas, que causan serios riesgos ambientales, problemas de salud y pueden resultar en la aparición de hongos resistentes al fungicida, incrementando los costos de producción para muchos agricultores en regiones tropicales (Onyeka et al. 2006). Teniendo en cuenta estos aspectos se hace necesario llevar a cabo investigaciones que busquen estrategias de manejo integrado como alternativa al inadecuado uso de agroquímicos en los diferentes cultivos. En este trabajo, se evaluaron seis cepas de *Trichoderma* spp. como agentes antagonistas para el control de *B. cinerea*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*., así como también extractos vegetales de Fique (*Furcraea macrophylla* Baker), *Tagetes patula* Link., *Swinglea glutinosa* Merr. (Ecoswing®) y adicionalmente lixiviado de raquis de plátano.

2.1.6.3. Metodología

Reactivación de Aislamientos

Se realizó la reactivación de aislamientos[9] conservados en papel filtro dos de *C. gloeosporioides* y dos de *C. acutatum,* que fueron aislados de tallos y frutos de mora afectados por Antracnosis. Así mismo, se reactivó un aislamiento de *B. cinerea* de la colección de microorganismos del laboratorio de Patología (CIAT), y dos cepas de *C. acutatum* aislados de lulo (Tabla 16).

Tabla 16. Aislamientos reactivados de los patógenos a controlar con las alternativas propuestas.

Aislamiento	Especie	Patogenicidad	Municipio
BuU-130	*C. gloeoesporioides*	Muy alta	Buga
TrC-106	*C. gloeoesporioides*	Muy alta	Trujillo
GiC-23f	*C. acutatum*	Baja	Ginebra
PaA-29C2	*C. acutatum*	Baja	Palmira
71	*C. acutatum*.	Muy alta	Timbio
40a	*C. acutatum*	Alta	Santa Rosa
12v	*Botrytis cinérea*	-	Ginebra

[9] A partir del trabajo realizado por Arenas (2007) sobre caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de mora en el Valle del Cauca.

Alternativas de control propuestas (Pruebas *In vitro*)

Se evaluó la capacidad inhibitoria de tratamientos alternos de control de seis aislamientos de *Trichoderma* spp. y extractos de plantas como *T. patula,* Ecoswing®*, F. macrophylla* y adicionalmente lixiviado de raquis de plátano. Para esto se llevaron a cabo pruebas *In Vitro* y una prueba en invernadero para validar los resultados *In Vitro* en plantas inoculadas, lo cual se realizó como se describe a continuación:

Evaluación de cultivos duales

Con los aislamientos de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *B. cinerea* puros, se realizaron las pruebas *in Vitro* con las alternativas de control propuestas. Las evaluaciones de antagonismo se realizaron en medio PDA con ácido láctico (39 g PDA y 10 ml de ácido láctico 25% por litro de medio). Las evaluaciones se realizaron cada dos días durante 10 días, registrando el radio de crecimiento de los patógenos hacia *Trichoderma* spp.
En el último día de evaluación, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (ICR) mediante la fórmula de Dennis y Webster (1971):

ICR (%) = (R1-R2) 100/R1, donde R1 es la distancia más lejana recorrida por el patógeno y R2 es la distancia recorrida por el patógeno hacia el antagonista.

Evaluación de Filtrados libres de las cepas de *Trichoderma* spp.

En un segundo ensayo se realizó la evaluación del filtrado libre de las cepas de *Trichoderma* spp. enfrentadas anteriormente, a excepción de la cepa 47-PDA-3A la cual fue reemplazada por el producto Tichotrópico® (mezcla de *T. harzianum* y *T. koniingi*, producido por Soluciones Microbianas del Trópico), debido a que presentaba morfología y comportamiento muy similar a la cepa 19-TSM-3A, y a que se presentó la oportunidad de probar el producto en mención.

Evaluación de Extractos vegetales

Para evaluar los extractos de *Swinglea glutinosa* (Ecoswing®) al 2%*,* de Fique al 10% (concentración más efectiva en el control de *C. gloeoesporioides* en guanábano reportada por Rojas (2008)), *Tagetes patula* al 5% y Lixiviado de Raquis de Plátano LRP al 10%, se prepararon medios de cultivo PDA modificados con cada uno de los extractos.

Evaluación de control químico

Mirage® (Ingrediente activo: Procloraz) fue evaluado en dosis comercial de 1.0 mL/L de agua (450 g/L de ingrediente activo, Procloraz), este tratamiento constituyó el control (-), para realizar las comparaciones con los diferentes extractos vegetales. Cada uno de los extractos fue utilizado para preparar medios

modificados con PDA como base (39g/L de agua destilada) en la concentración especificada para cada uno.

En cada uno de los medios preparados, se realizaron mediciones del diámetro de crecimiento de cada uno de los patógenos, cada dos días después de la siembra, durante 12 días para *B. cinerea*, 14 días para los aislamientos de *Colletotrichum* de mora y 16 días para los *C. acutatum* de lulo. Como testigos se utilizaron PDA y Procloraz, fungicida reportado como efectivo por Rojas (2008) en la inhibición *In Vitro* de *C. gloeoesporioides* obtenido de guanábana.

Todas las pruebas *In Vitro* se realizaron en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) para *B. cinerea*, y en un diseño de parcelas divididas tanto para los aislamientos de *Colletotrichum* de mora como para los *C. acutatum* de lulo, con cuatro repeticiones y tomando una caja petri como unidad experimental.

Evaluación en Invernadero

Este ensayo se llevó a cabo en cámara húmeda a una temperatura de 24º y humedad relativa de 60-70%. Los tratamientos se aplicaron, a plantas de mora variedad Castilla de cinco meses de edad, susceptible al patógeno *C. gloeosporioides* establecidas en potes. Los tratamientos evaluados fueron la cepa comercial Trichoplant® y la cepa TrmV-01(colección CIAT), las cuales presentaron el mejor comportamiento como antagonista en las pruebas *In Vitro*, y el extracto de *T. patula* y el producto Ecoswing®, siendo estos los tratamientos más efectivos determinados en las pruebas *in Vitro,* para el control de *C. gloeosporioides.*

Estos tratamientos fueron evaluados en planta, contra un testigo sin aplicación de productos y otro con Procloraz (ingrediente activo de Mirage®).

Los tratamientos se aplicaron, una semana antes, el mismo día y una semana después de la inoculación del patógeno. La inoculación se hizo mediante una herida superficial en la epidermis del tallo principal, en donde se colocó un disco de medio con micelio del aislamiento más agresivo de *C. gloeosporioides,* adherido al tallo con parafilm. Las plantas se dejaron en cámaras húmedas durante 72 horas. Las evaluaciones se iniciaron 5 días después de la inoculación con el patógeno y posteriormente durante 20 días más, cada 5 días. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo con la escala de severidad de Afanador-Kafuri (2009), la cual se presenta a continuación:

Grado 1: Desarrollo de callo en el sitio de la inoculación (0%)
Grado 2: Desarrollo de lesión necrótica alrededor del sitio de la inoculación (3%)
Grado 3: Lesión necrótica más marchitamiento (15%)
Grado 4: Lesión necrótica más amarillamiento y muerte de hojas comprometidas con la zona de inoculación o por encima de ésta (25%).
Grado 5: Muerte de hojas comprometidas con la zona de inoculación o por encima de ésta. Muerte del ápice de la planta (45%).
Grado 6: Muerte completa de la planta o rama (75%).

La prueba en invernadero se realizó en un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones y tomando una planta como unidad experimental.

2.1.6.4. Resultados y discusión

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos no cumplieron con la prueba de Normalidad (Kolmogorov-Smirnov $p<0.05$), debido a esto se realizó una transformación arcoseno de los datos, sin embargo, estos tampoco cumplieron con el supuesto de Normalidad, por lo cual se realizó un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis (Tabla 17).

Tabla 17. Prueba de Normalidad y homogeneidad de varianza de los datos transformados para los ensayos realizados con los diferentes patógenos.

Patógeno	Ensayo	Normalidad (K-S)	Homogeneidad de Varianza (Levene)
B. cinérea	Cultivos duales	d=0.248 p<0.05	0.1925
	Filtrados libres	d=0.254 p<0.05	0.0340
	Extractos vegetales	d=0.194 p>0.2	0.0130
Colletotrichum (mora)	Cultivos duales	d=0.233 p<0.01	0.0000
	Filtrados libres	d=0.231 p<0.01	0.0000
	Extractos vegetales	d=0.318 p<0.01	0.0000
C. acutatum (lulo)	Cultivos duales	d=0.357 p<0.01	0.0000
	Filtrados libres	d=0.179 p<0.1	0.0000
	Extractos vegetales	d=0.236 p<0.01	0.0000

Evaluación de cultivos duales

El análisis de varianza (Kruskal-Wallis) mostró diferencias significativas ($P<0.001$) en lo que se refiere a control del crecimiento de todos los patógenos en general. A partir de estos resultados, se realizó una comparación múltiple, encontrándose diferencias en la inhibición de los patógenos entre las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas. El análisis se realizó por medio del Software Statistix 8.0.

Inhibición de *Botrytis cinerea*

A partir del análisis de varianza (K-W=25.014; $p<0.01$) para *B. cinerea*, se encontraron diferencias significativas en la inhibición ejercida por las cepas de *Trichoderma* evaluadas. Para *B. cinerea*, se encontró que las cepas con mayor antagonismo y por lo tanto las que permitieron un menor crecimiento del patógeno, fueron TrmV-01 seguido por 19-TSM-3A, representando una inhibición de 42.77% y 37.77% respectivamente. Un segundo grupo de cepas mostraron una inhibición intermedia de *B. cinerea*, entre los que se encuentran 47-PDA-3A, *T. viride* y Agroguard® con un 33.33%, 27.77% y 21.11% de inhibición respectivamente, entre las cuales no se presentaron diferencias significativas.

El producto Trichoplant® mostró la menor inhibición del patógeno con 2.77%. En la figura 55a, se puede observar la tendencia en el crecimiento de *B. cinerea* al

enfrentarla contra las seis cepas de *Trichoderma* spp., el cual se incrementó hasta el segundo día de evaluación, día en el que el crecimiento se detuvo siendo constante hasta el último día de evaluación. En la figura 55b se muestran los porcentajes de inhibición promedio de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas.

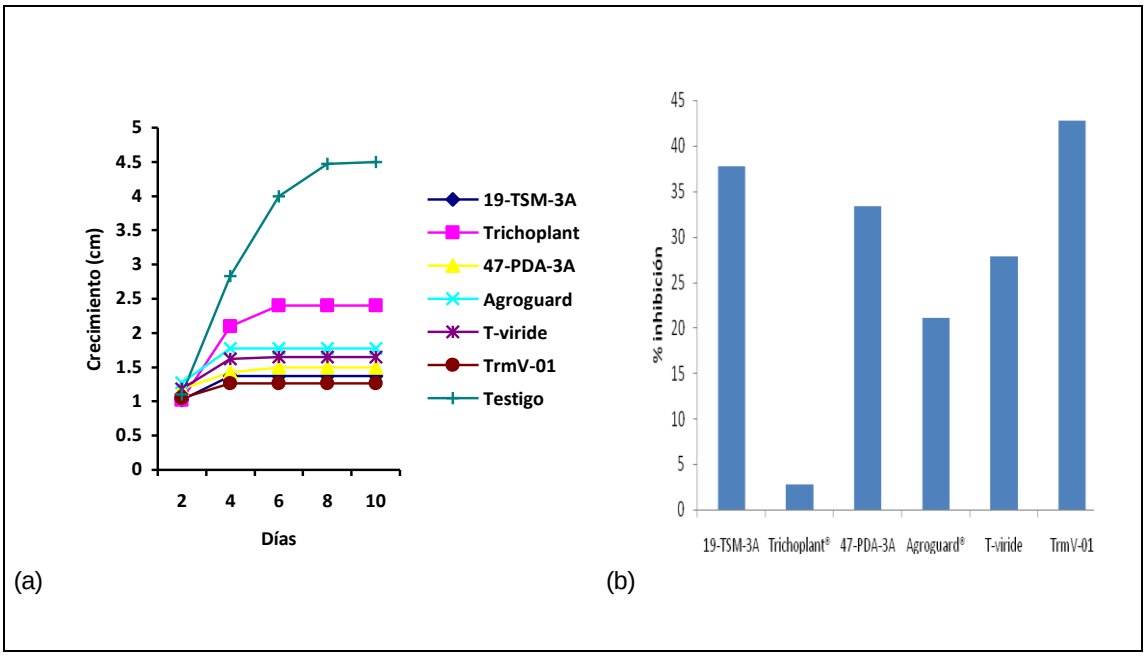


Figura 55. (a) Crecimiento radial a través del tiempo de *B. cinerea* al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*, al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp.

Inhibición de *Colletotrichum* spp. de mora

Para *C. gloeosporioides y C. acutatum* aislados de mora, a partir del análisis de varianza Kruskal-Wallis y la comparación múltiple (K-W=71.44; p<0.001), se encontró que existen diferencias significativas en el control por parte de las cepas de *Trichoderma* evaluadas.

Para los aislamientos de *C. gloesporioides* (Cg1 y Cg2) y *C. acutatum* (Ca1 y Ca2) de mora en general, se encontró que entre las cepas TrmV-01, Agroguard®, *T. viride,* 19-TSM-3A y 47-PDA-3A, representando porcentajes de inhibición del 69.30%, 68.75%, 66.8%,62.77% y 63.47% respectivamente, no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la inhibición del crecimiento de los patógenos, a diferencia de Trichoplant® que mostró la menor inhibición con 21.12%.

El análisis se realizó en general, para los cuatro aislamientos de *Colletotrichum* de mora el último día de evaluación, sin embargo, en las figura 56a-59a, se puede observar la tendencia en el crecimiento de cada uno de los aislamientos (Cg1, Cg2, Ca1 y Ca2), siendo exponencial hasta el segundo día de evaluación, día en

el cual *Trichoderma* spp. llega hasta el patógeno, y es hasta este momento en que permite que el patógeno crezca.

Para el aislamiento de *C. gloeosporioides* (Cg1) en particular, el tratamiento que más inhibió el crecimiento fue TrmV-01 con un 63.33%, seguido por Agroguard® con 62.22%, y el que menor inhibición ejerció fue Trichoplant® con 6.66% (Figura 56b).

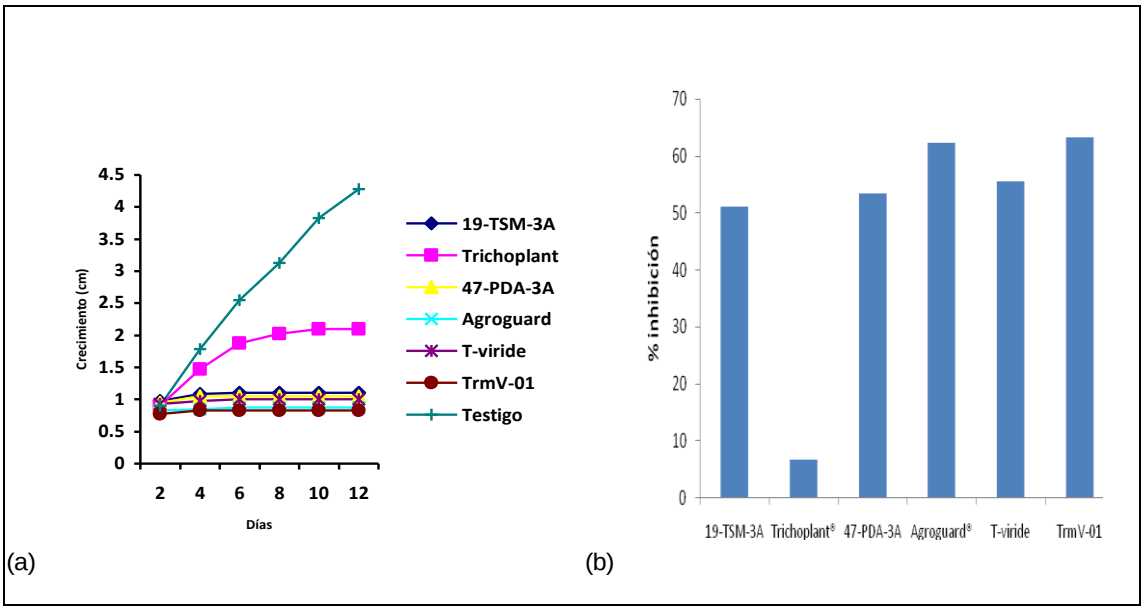


Figura 56. (a) Crecimiento radial a través del tiempo de *C. gloeosporioides* (Cg1) al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* (Cg1), al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *C. gloeosporioides* (Cg2), el tratamiento más efectivo en la inhibición del crecimiento fue TrmV-01 con un 58.88%, seguido por Agroguard® con 57.77%, y el que menor inhibición ejerció fue Trichoplant® con 2.2% (Figura 57b) siendo evidente que el tratamiento con Trichoplant® permitió el mayor crecimiento del hongo.

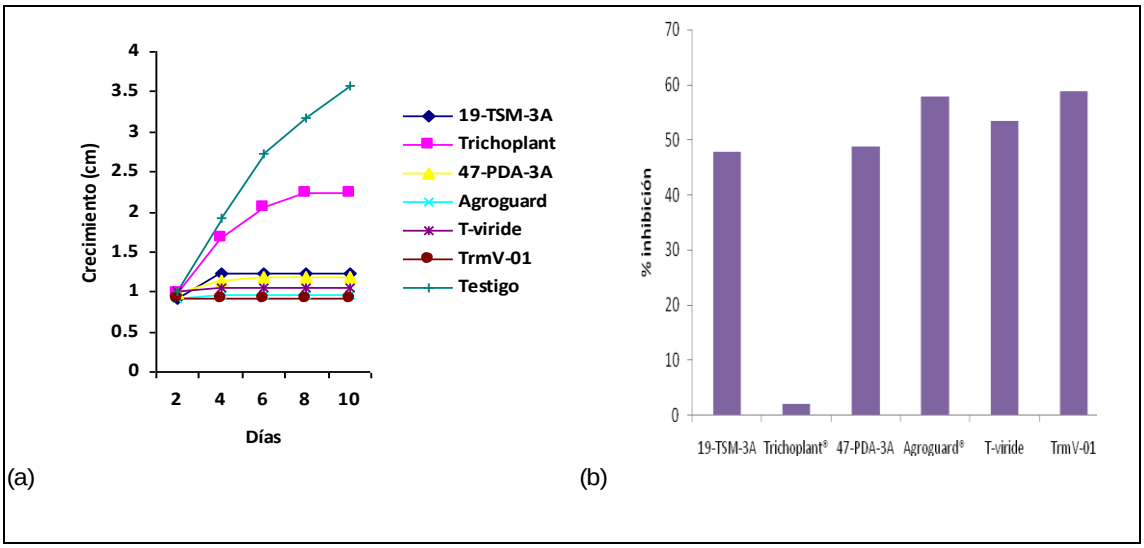


Figura 57 (a) Crecimiento radial de *C. gloeosporioides* (Cg2) al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* (Cg2), al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *C. acutatum* (Ca1) en particular, las cepas más efectivas fueron Agroguard® y 19-TSM-3A ambas con un 79.44% de inhibición del crecimiento del patógeno, seguido por *T-viride*, TrmV-01 y 47-PDA-3A con 78.88%, 78.33% y 77.77% respectivamente. La cepa menos efectiva fue Trichoplant® con 44.44 % de inhibición (Figura 58b).

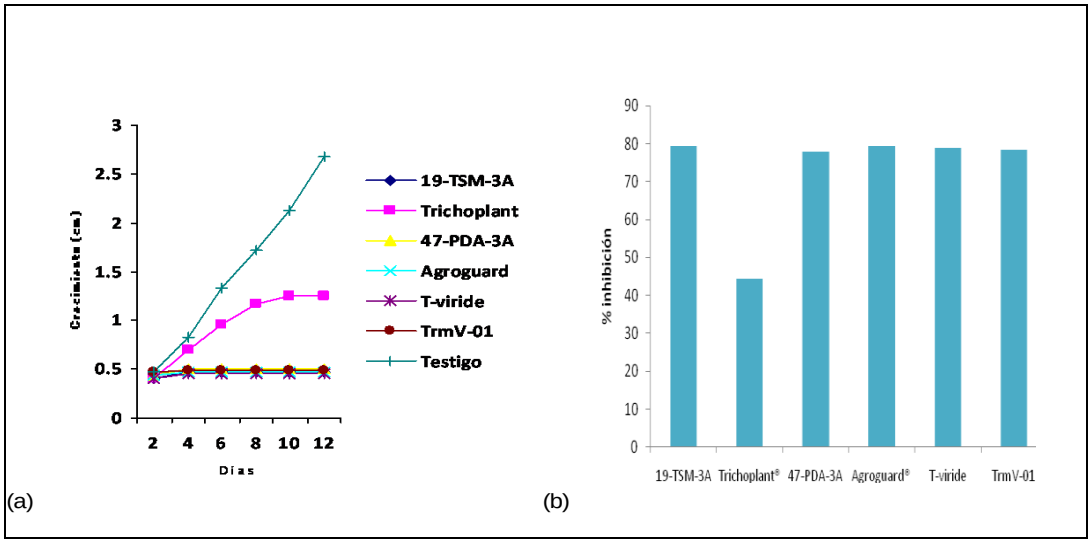


Figura 58. (a) Crecimiento radial a través del tiempo de *C. acutatum* (Ca1) al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. acutatum* (Ca1), al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp.

Para el aislamiento de *C. acutatum* (Ca2) en particular, la cepa más efectiva fue *T-viride* con 77.77% de inhibición de crecimiento del patógeno, seguido de TrmV-01, Agroguard®, 19-TSM-3A y 47-PDA-3A con 76.66%, 75.55%, 74.44% y 73.88%

respectivamente. La cepa menos efectiva fue Trichoplant® con 31.12 % de inhibición (Figura 59b).

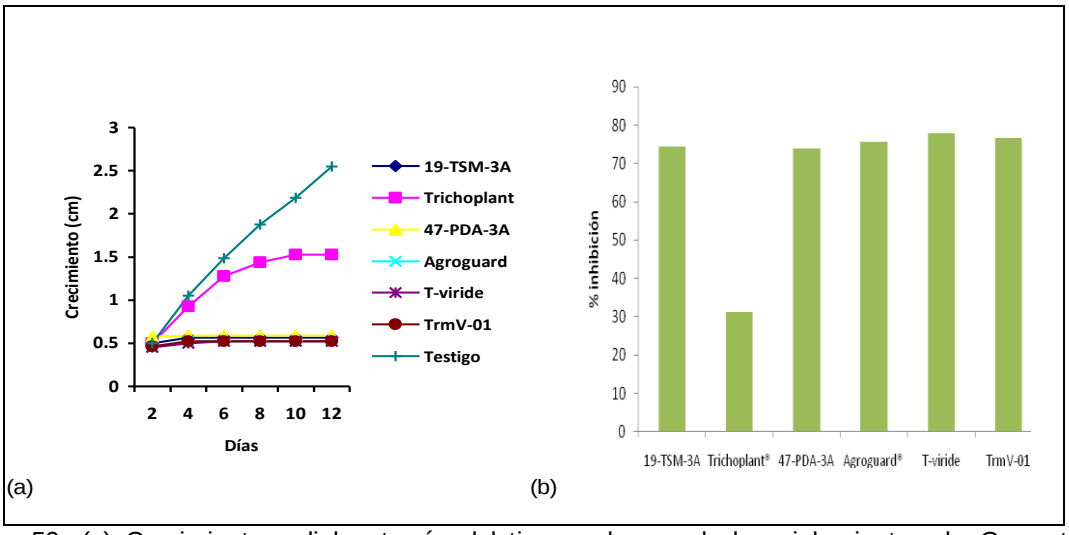


Figura 59. (a) Crecimiento radial a través del tiempo de uno de los aislamientos de *C. acutatum* (Ca2) al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. acutatum* (Ca2), al enfrentarlo con las seis cepas de *Trichoderma* spp.

Inhibición de *Colletotrichum acutatum* de lulo

Para los aislamientos de *C. acutatum* de lulo, se encontraron diferencias significativas entre las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, a partir del análisis de varianza y la comparación múltiple (K-W=47.43; p<0.001). Para los aislamientos de *C. acutatum* aislados de lulo, se encontró que en promedio las cepas de *Trichoderma* spp. con mayor antagonismo fueron Agroguard®, *T. viride* y TrmV-01 entre los cuales no hubo diferencias significativas, representando una inhibición de 78.88%, 77.77% y 76.66% respectivamente, seguido por la cepa 47-PDA-3A (63.46%) y 19-TSM-3A (62.77%) estos últimos ejerciendo una inhibición intermedia de los patógenos. Trichoplant®, al igual que con los otros patógenos, mostró la menor inhibición con un 44,44%. En las figuras 6a y 7a, se puede observar el porcentaje de inhibición por parte de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. con *C. acutatum* (C1) y (C2).

Con los aislamientos de *C. acutatum* de lulo, se presentó mayor porcentaje de inhibición en general para todas las cepas de *Trichoderma* spp., debido a que el crecimiento de este patógeno es más lento en comparación con el crecimiento de los demás patógenos tratados. En general, se presentó incremento del crecimiento de todos los patógenos hasta el segundo día de evaluación y fue en este día donde se detuvo el crecimiento (Figuras 60b y 61b).

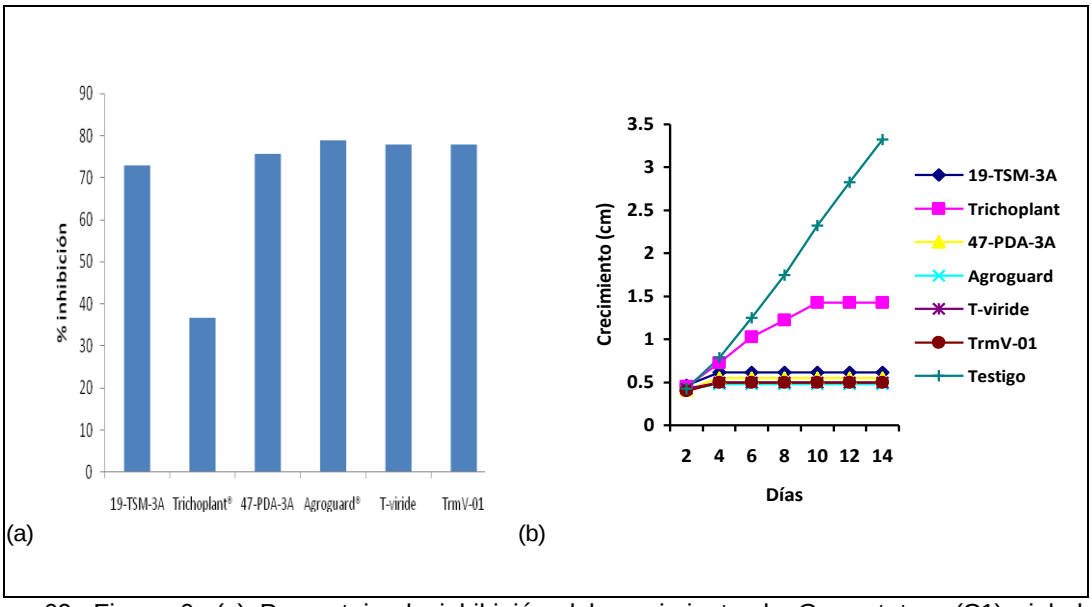


Figura 60. Figura 6. (a) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. acutatum* (C1) aislado de lulo, al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Crecimiento radial a través del tiempo de *C. acutatum* (C1) aislado de lulo al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp.

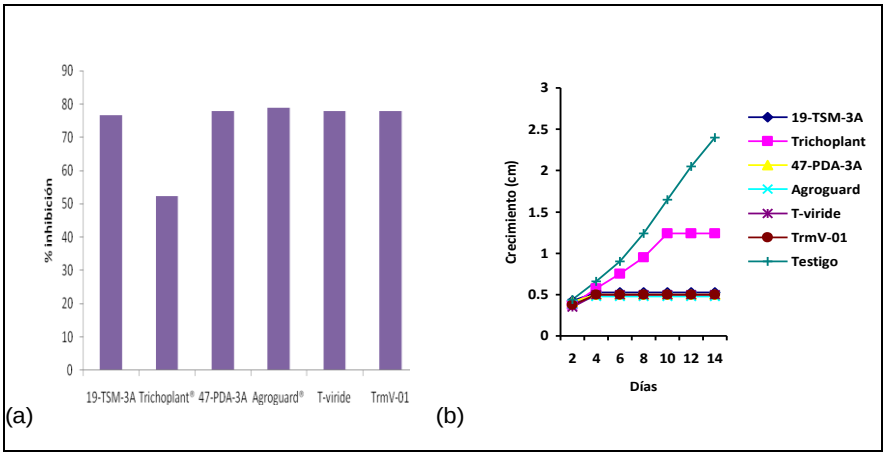


Figura 61. (a) Porcentaje de inhibición del crecimiento de *C. acutatum* (C2) aislado de lulo, al enfrentarla con las seis cepas de *Trichoderma* spp. (b) Crecimiento radial a través del tiempo de *C. acutatum* (C2) aislado de lulo al enfrentarlo contra seis cepas de *Trichoderma* spp.

Evaluación de filtrados libres de *Trichoderma* spp.

Inhibición de *B. cinerea*

Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* ejercidos por las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. Evaluadas. La cepa más efectiva en el control de *B. cinerea* fue Trichoplant®, que inhibió en un 72.5% el crecimiento de éste. En un segundo lugar, el grupo integrado por Trichotrópico®, *T. viride,* Agroguard® y TrmV-01, que presentó una inhibición intermedia con 59.8%, 56.9%, 56.6% y 49.66%, respectivamente. Finalmente, la cepa menos efectiva fue 19-TSM-3A la cual inhibió un 39% el

crecimiento del patógeno, sin embargo este resultado es superior al testigo (Figura 62).

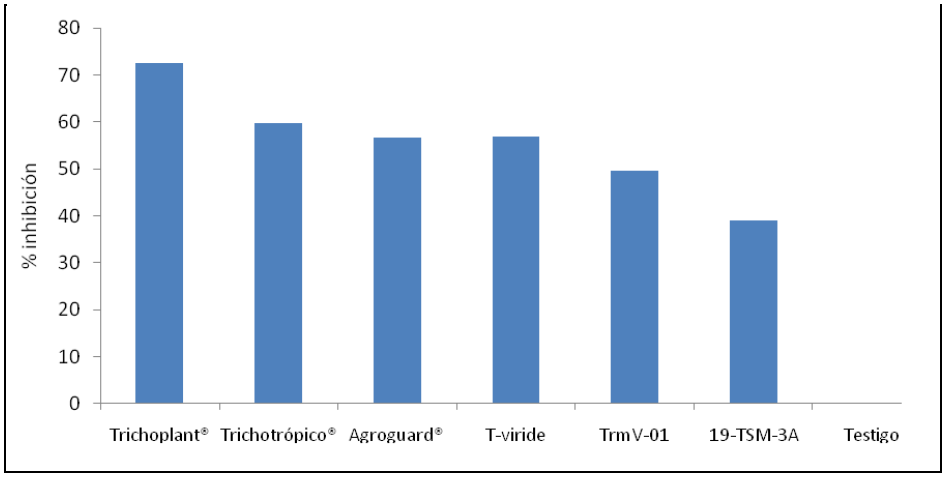


Figura 62 Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* al décimo día de evaluación con las seis cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas en filtrados libres.

Inhibición de *Colletotrichum* spp. de mora

Para los aislamientos de *Colletotrichum* de mora en general, se encontró que las cepas más eficientes en el control de los patógenos fueron Trichoplant®, Agroguard®, con promedios de inhibición de 37.5% y 36.2% respectivamente, seguido por *T.viride,* Trichotrópico, TrmV-01, con promedios de 30.9%, 29.9% y 9.34% respectivamente. La cepa menos eficiente fue 19-TSM-3A, la cual en algunos casos permitió mayor crecimiento que el testigo.

Para Cg1 en particular, se encontró que la cepa más eficiente fue Trichoplant® con 56.4% de inhibición, seguido por TrmV-01 con 9.7%. En general se observó una baja eficiencia en la inhibición del crecimiento con las cepas Agroguard® (3.6%), Trichotrópico® (2.5%) y *T. viride* (2.8%) (Figura 63a). La cepa menos eficiente fue 19-TSM-3A con 0.3% de inhibición.

Para Cg2, se encontró que la mayor inhibición se presentó con Trichoplant® con 59.2%, seguido por Agroguard® la cual inhibió el 25% del crecimiento del patógeno. Las cepas menos efectivas fueron Trichotrópico® con 1.1%, *T. viride* 3.3%, TrmV-01 con 6.1% y 19-TSM-3A que no ejerció inhibición (0%) (Figura 63b).

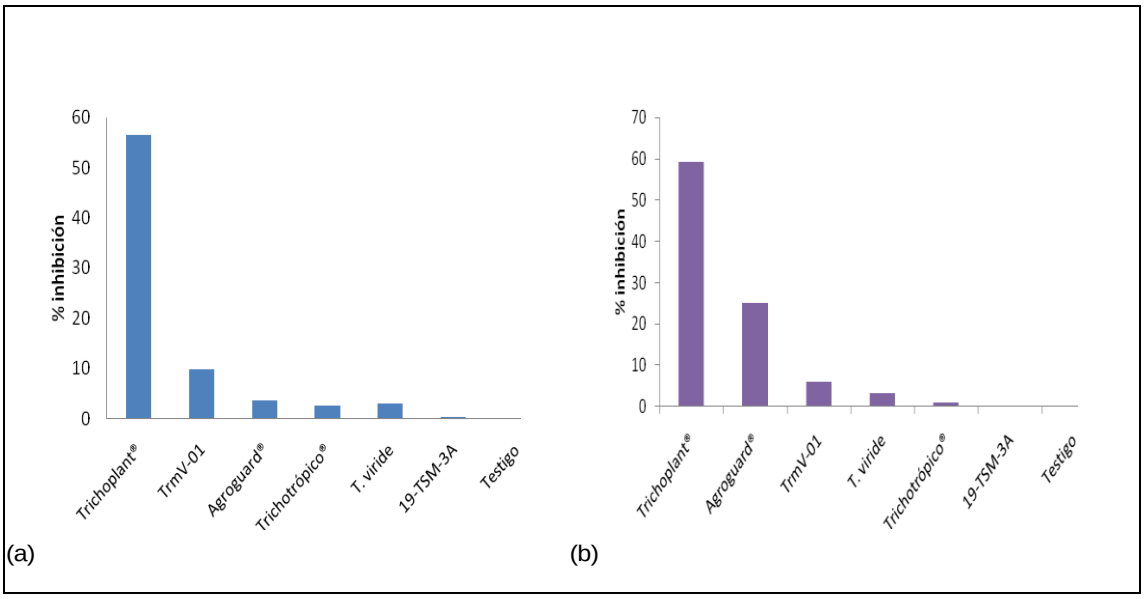


Figura 63. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* Cg1(a) y Cg2 (b) al décimo día de evaluación con las seis cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas.

Inhibición de *Colletotrichum acutatum* de lulo

Para los aislamientos de *C. acutatum* de lulo en general, se encontró que las cepas de Trichoderma que ejercieron mayor inhibición fueron Agroguard® con 50.1%, Trichoplant® con 47.32%, *T-viride* con 47.3%, entre las cuales no se encontraron diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de los patógenos, seguido por Trichotrópico® con 45.5% y TrmV-01 con 18.5%. La cepa menos eficiente fue 19-TSM-3A, la cual no presentó diferencias significativas con el testigo, permitiendo en algunos casos un mayor crecimiento que en este.

Durante la evaluación se observaron diferencias en la respuesta de los dos aislamientos de *C. acutatum* a las cepas de *Trichoderma* evaluadas. Para C1 en particular se encontró que las cepas que ejercieron mayor inhibición fueron Agroguard® con 77.13%, seguido por *T. viride* con 73%, y Trichotrópico® con 67.5%. Trichoplant® ejerció inhibición intermedia del patógeno con 35%, sin embargo esta fue mayor que el testigo. Las cepas TrmV-01 y 19-TSM-3A (3% y 0% respectivamente) ejercieron una baja inhibición del patógeno, siendo similar al testigo (Figura 64a).

Para C2, se encontró un efecto contrario a C1, en donde Trichoplant® fue el que ejerció una mayor inhibición en el crecimiento representando un 60%. En orden de inhibición, TrmV-01 fue el que ejerció una mayor inhibición después de Trichoplant®, con un 33.7%. Las cepas Trichotrópico®, Agroguard® y *T. viride* ejercieron inhibiciones del 23.5%, 23.2% y 21.5% respectivamente, las cuales aunque presentaron las más bajas inhibiciones fueron diferentes al testigo. La cepa menos eficiente fue 19-TSM-3A, la cual muy similar al testigo (Figura 64b).

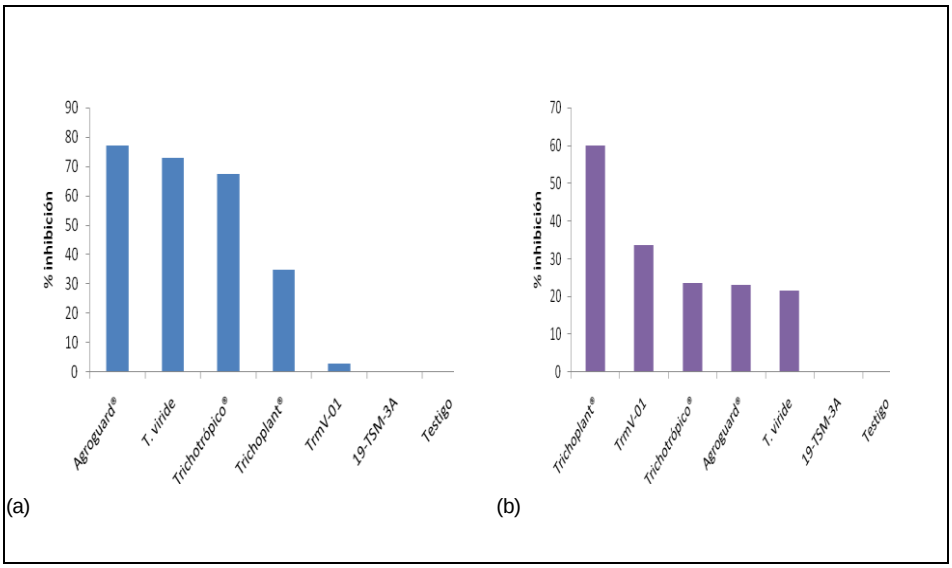


Figura 64. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum acutatum,* C1 (a) y C2 (b) de lulo al décimo día de evaluación con las seis cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas.

Evaluación de Extractos vegetales

En general, se encontró que los diferentes extractos vegetales evaluados redujeron la tasa de crecimiento de los patógenos en diferentes proporciones, permitiendo en la mayoría de los casos el desarrollo tardío o nulo del crecimiento de los hongos.

Inhibición de *Botrytis cinerea*

Se encontró que el tratamiento que inhibió completamente el crecimiento de *B. cinerea* fue el extracto de *T. patula* el cual no presentó diferencias significativas con Procloraz, representando inhibición del 100%. Los tratamientos con Ecoswing (71.3%), Lixiviado de raquis de plátano (LRP) (71.6%) y Fique (33%), ejercieron inhibiciones más bajas, pero significativamente mayores al testigo, siendo el tratamiento con extracto de fique el menos eficiente (Figura 65). Es de resaltar, que el efecto del LRP en los cuatro primeros días fue similar al de *T. patula* y Procloraz, sin presentar diferencias significativas entre estos tratamientos; sólo a partir del quinto día de evaluación se logró observar crecimiento del patógeno sobre el medio que contenía LRP, igualando el crecimiento con Ecoswing®.

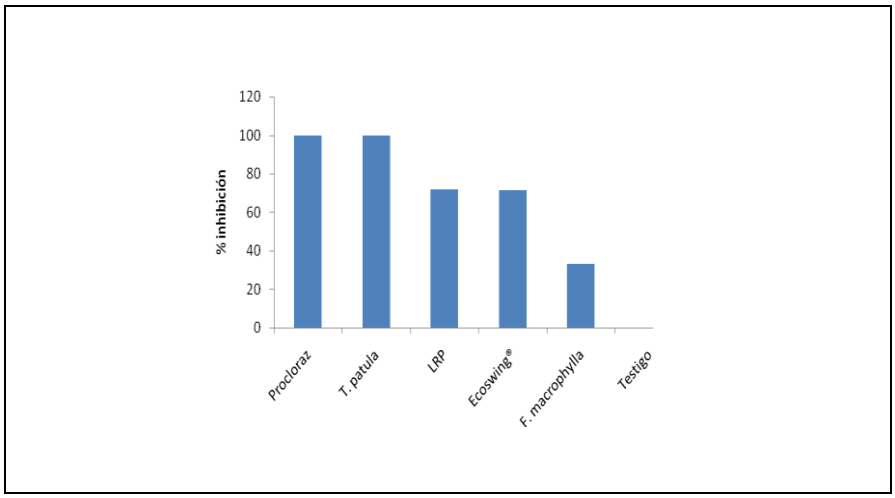


Figura 65. Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* doce días después de sembrado en medio PDA modificado con extractos vegetales.

Inhibición de *Colletotrichum* spp. de mora

Para los aislamientos de *Colletotrichum* de mora en general, se encontró que los tratamientos más efectivos en la inhibición del crecimiento de los patógenos fueron *T. patula* y Ecoswing, los cuales no presentaron diferencias significativas con Procloraz, ihnibiendo completamente el crecimiento de los patógenos (100%) (Figura 66). Por otro lado, el tratamiento con Fique (*F. macrophylla*) y el LRP, fueron los tratamientos menos eficientes en la inhibición de los patógenos con 42.4% para fique y 0% para LRP, es importante resaltar que aunque con el extracto de fique no fue alta sí se presentó inhibición de los patógenos.

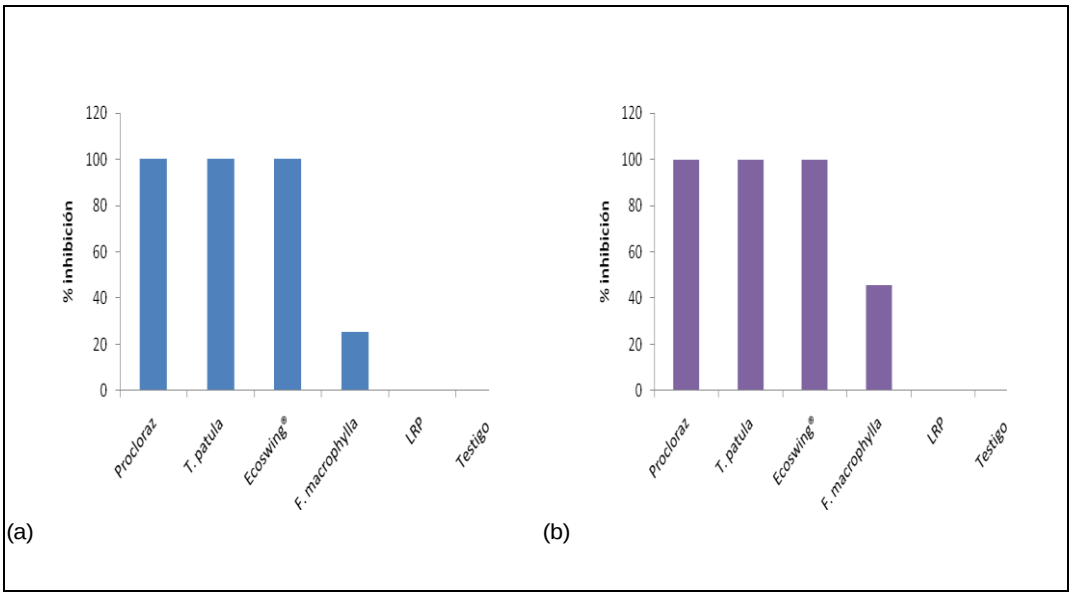


Figura 66. Porcentaje de inhibición de *Colletrotrichum gloeosporioides* (a) Cg1, (b) Cg2, de mora, 14 días después de sembrados en medio PDA modificado con extractos vegetales.

Para los aislamientos de *C. acutatum* en particular, se encontró que los tratamientos más efectivos fueron *T. patula* y Ecoswing, inhibiendo al 100% el crecimiento de estos patógenos. El extracto de fique ejerció inhibición intermedia de 47.3% para Ca1 y 51.2% para Ca2, sin embargo fue superior al testigo PDA (Figura 14).

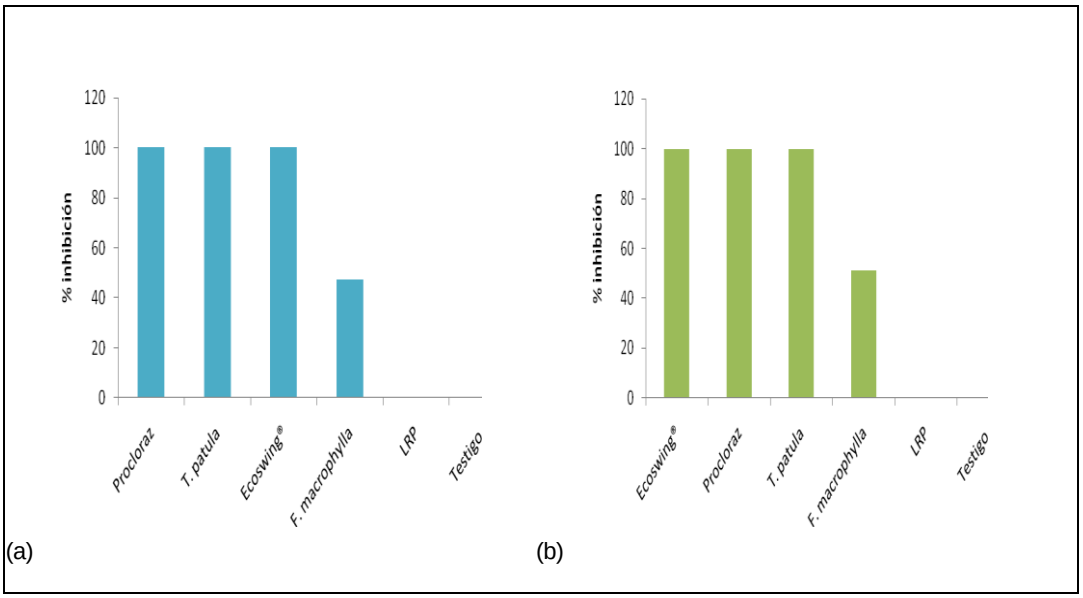


Figura 67. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum acutatum* (a) Ca1 y (b) Ca2, de mora, 14 días después de sembrados en medio PDA modificado con extractos vegetales.

Inhibición de *C. acutatum* de lulo

Se encontró que para los aislamientos de *C. acutatum* de lulo, el tratamiento que más inhibió el crecimiento de los patógenos fue *T. patula*, presentando inhibición promedio del 100% siendo similar al tratamiento con Procloraz. En orden de inhibición, se encontró que el tratamiento con Ecoswing®, fue el que mayor inhibición ejerció después de *T. patula*, presentando inhibición del 68.2% y 73.5% para C1 y C2 respectivamente, sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre este y el extracto de fique, el cual presentó inhibición del 55.7% y 56.9 % para C1 y C2 respectivamente (Figura 15). Sin embargo, es importante mencionar que durante los primeros diez días de evaluación el crecimiento de los patógenos en el tratamiento con Ecoswing® fue nulo, siendo similar a Procloraz y *T. patula,* sólo inició el crecimiento a partir del quinto día de evaluación, contrario al tratamiento con *F. macrophylla*, el cual tuvo un crecimiento más lento que el testigo, pero constante desde el primer día de evaluación. El tratamiento menos efectivo fue el LRP, el cual presentó inhibición nula, siendo similar al testigo PDA (Figura 68).

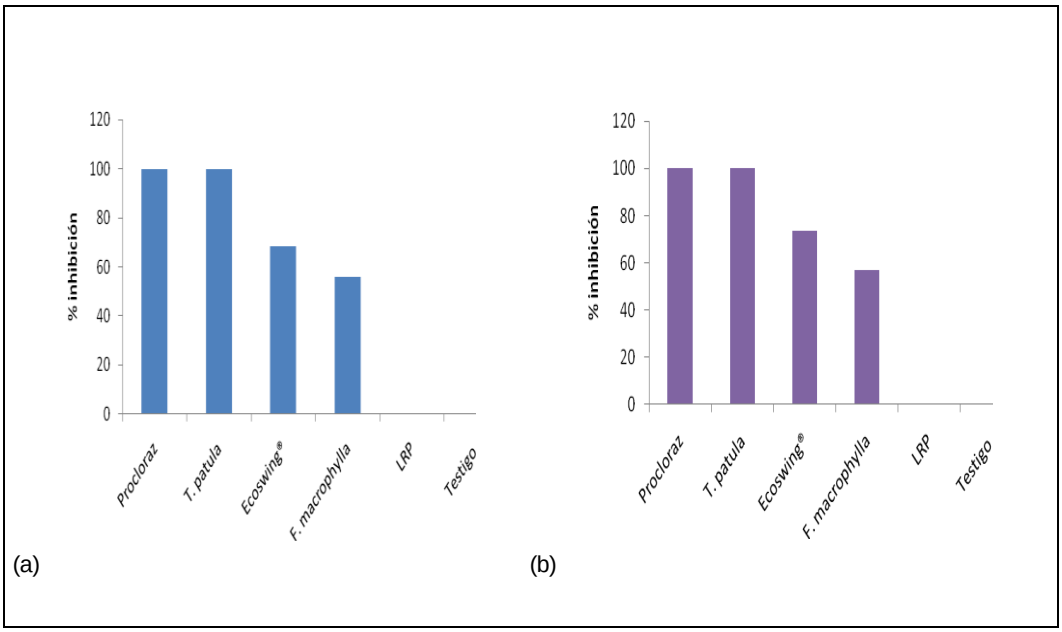


Figura 68. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum acutatum* (a) C1 y (b) C2, de lulo, 14 días después de sembrados en medio PDA modificado con extractos vegetales.

Prueba en Invernadero

Se encontró que el tratamiento que más redujo el progreso de la enfermedad fue TrmV-01 el cual presentó un comportamiento muy similar al testigo (agar), Trichoplant® y seguido por Procloraz. Las plantas tratadas con Ecoswing® no presentaron diferencias con las que fueron inoculadas únicamente con *C. gloeosporioides,* siendo este el tratamiento menos efectivo en la reducción del progreso de la enfermedad (Figura 69).

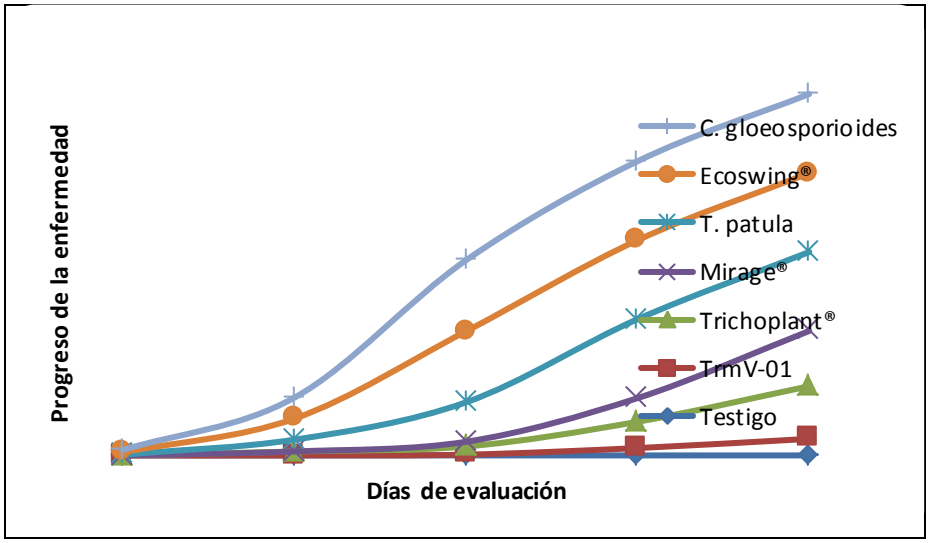


Figura 69.Progreso de la enfermedad de plantas de mora inoculadas con *Colletotrichum gloeosporioides*, sometidas a los tratamientos más efectivos determinados *In Vitro* para el control de este patógeno.

2.1.6.5. Conclusiones

En general, todas las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas mostraron inhibición del crecimiento de los patógenos, tanto en cultivos duales como en los filtrados libres, en algunos casos con inhibiciones superiores al 75%, que representan porcentajes de inhibición altos en miras de seleccionar las cepas evaluadas como potenciales biocontroladores.

Las cepas Agroguard® (*T. harzianum*) y TrmV-01 (*T. koningiopsis*), mostraron una capacidad antagónica eficiente con todos los patógenos en general, en las evaluaciones de cultivos duales, siendo la competencia por espacio-nutrientes y el micoparasitismo los mecanismos a resaltar ejercidos por estas cepas.

Los mecanismos de acción que *Trichoderma* spp. ejerce, pueden operar de manera simultánea o independiente dependiendo en muchos casos del patógeno a controlar, y de la cepa de *Trichoderma* spp. con la que se está realizando el control, por lo cual entender la existencia de esa relación de especificidad entre Patógeno-*Trichoderma* spp., puede llegar a determinar el éxito en el control de los patógenos.

En los ensayos *In Vitro, T. patula* fue el extracto vegetal que mostró mayor inhibición (100%) del crecimiento de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *B. cinerea*, seguido de Ecoswing®, y *F. macrophylla*; esto proporciona una alternativa en miras de minimizar el uso de agroquímicos perjudiciales, no obstante, es importante hacer más investigaciones que proporcionen información acerca de los componentes y el efecto que estos pueden tener sobre los cultivos, los consumidores y el medio ambiente, para que puedan ser identificados como una alternativa potencial viable en el reemplazo de los agroquímicos.

Los tratamientos evaluados, tanto biocontroladores como extractos vegetales, proporcionan una alternativa para el manejo y control de los patógenos, mostrando una alta especificidad, hacia algunos microorganismos, lo que puede ser la base para incrementar y mejorar el manejo de las enfermedades.

La evaluación de los tratamientos con el método de inoculación utilizado, demuestra que *Trichoderma* spp. ejerce competencia sobre *C. gloeosporioides* al ser colocados juntos en heridas hechas en el tallo de la planta, sin embargo, este mismo método no fue eficiente para las aplicaciones de los extractos vegetales, por lo que se concluye que estos disminuyen su eficiencia cuando el hongo entra en contacto directo con la herida facilitando el desarrollo de la enfermedad.

Se recomienda hacer evaluaciones en plantas inoculadas por el método de aspersión tanto para el patógeno, como para los tratamientos a evaluar (antagonistas y extractos vegetales) y de esta manera determinar la efectividad de estos tratamientos para futuras aplicaciones en campo.

Por otro lado, es importante hacer pruebas con diferentes concentraciones para todos los tratamientos evaluados *In Vitro* y de esta forma determinar la dosis mínima de inhibición del patógeno para posteriores aplicaciones en plantas.

2.1.6.6. Bibliografía

ÁLVAREZ, E., C.X. GRAJALES, J. VILLEGAS & J. LOKE. 2001. Control del Mildeo Polvoso (*Sphaeroteca pannosa* var. *rosae*) en Rosa (*Rosa* sp.) usando un lixiviado de Compost del Raquis de Plátano (*Musa* AAB). Asocolflores pp. 41-47.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(01):4-10.

SUTTON, B.C. 1992. The genus Glomerella and its anamorph *Colletotrichum*. P1-26. En Bailey J.A & Jeger M.J. (eds). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control: CAB International, Wallingford, England.

WHARTON, P.S. & D. URIBEUNDO. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum.* Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61(1):3-22.

YEDIDIA, I., N. BENHAMOU & I. CHET. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum.* App. Environ. Microbiol. 65:1061-1070.

2.1.7. Evaluación in-vitro del efecto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* nees), para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (penz) penz. & sacc.) en el cultivo de mora (*Rubus glaucus* benth) [10]

Objetivo del proyecto (3): *"Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.1.7.1. Marco Referencial

Se evaluó el efecto del extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees), sobre la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz), bajo condiciones *In* vitro, observando el desarrollo y crecimiento micelial a través del tiempo en cada uno de los tratamientos. Este trabajo se desarrolló tanto en las instalaciones de ICA Manizales donde se hizo el aislamiento y cultivo del hongo C. *gloeosporioides* puro a partir de tejidos afectados de mora y en el laboratorio de sanidad vegetal de UNISARC, donde se desarrolló la prueba in vitro. Se analizaron dos variables, la primera fue la obtención del cultivo monospórico de *Colletotrichum gloeosporioides* para evaluar el crecimiento radial del hongo sometido a diferentes concentraciones de extracto de canela y la segunda variable fue la determinación de la capacidad inhibitoria del extracto de canela en diferentes concentraciones sobre el hongo C. *gloeosporioides* bajo pruebas in vitro. Esta investigación corresponde a un estudio

[10] Nathalia Acevedo Bernal, Jesús Zuleta Ospina. Estudiante Décimo Semestre de Agronomía con énfasis en Agricultura Orgánica, UNISARC, Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia
[2] Ingeniero Agrónomo y docente de UNISARC

exploratorio y descriptivo. El diseño experimental se instaló completamente aleatorizado, la unidad experimental fue conformada por cada una de las cajas petri con el medio de cultivo, el tratamiento correspondiente según el diseño experimental y el inoculo de *C. gloeosporioides*. La descripción de los tratamientos evaluados correspondieron de la siguiente manera: tratamiento 1 (5 ppm), tratamiento 2 (10 ppm), tratamiento 3 (20 ppm) y el tratamiento 4 (30 ppm) de extracto de canela al 94% de pureza, un testigo químico (score al 0.6 cc/l) y un testigo absoluto donde se aplicó agua destilada estéril, se manejaron 10 repeticiones por tratamiento.

De acuerdo con los resultados el máximo desarrollo del cultivo de *C. gloeosporioides*, en PDA (Papa Dextrosa Agar) se obtuvo sobre el tratamiento 6 (testigo), donde solo se aplicó agua destilada estéril. El comportamiento del tratamiento 6 (testigo - agua destilada estéril) dos días después de la siembra del patógeno (primer registro), presentó un crecimiento radial de 12.1 mm correspondiente a un área de (35.1 mm^2), mientras que en los demás tratamientos el desarrollo fue cero (0). El segundo registro se realizó cuatro días después de la siembra del inóculo y se encontró que en todos los tratamientos se inició el crecimiento de la colonia del hongo, siendo el de menor desarrollo el tratamiento 5 (score) 0.2 mm, seguido del tratamiento 1 (5 ppm de extracto de canela) 2.8 mm, mientras el testigo avanzó rápidamente colonizando gran parte del medio de cultivo 28.6 mm.

En el registro realizado seis días después de siembra del inóculo, se pudo observar que el tratamiento con Score inhibió el crecimiento de la colonia del hongo a partir de los cuatro días y así se mantuvo durante todo el tiempo del experimento. En términos generales se encontró que el crecimiento de las colonias solo se dio hasta la medición 3, porque a partir del registro 4 el crecimiento radial para todos los tratamientos (5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm y score), se mantuvo. En términos generales se pudo concluir que el extracto de canela posee un acción fungicida y Las concentraciones del extracto de canela más eficientes son las de los tratamientos 1 (5 ppm) y la del tratamiento 4 (30 ppm).

El desarrollo de la investigación conduce a establecer una cultura en el manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth) bajo el concepto de producción limpia y buenas prácticas agrícolas; este estudio se realizó con el fin de conocer la efectividad del extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) para el control de *Colletotrichum gloeosporoides* Penz. En el cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth), cuyas pruebas preliminares de efectividad se realizaron a nivel in-vitro. Teniendo en cuenta lo anterior y las necesidades de los agricultores de obtener beneficios económicos para el manejo de sus cosechas, el presente estudio pretende desarrollar una serie de herramientas basadas en el manejo integrado de enfermedades en el cultivo de la mora que afectan el sistema de producción, ya que este cultivo es viable económicamente y ambientalmente manejable. Los nuevos mercados exigen productos altamente competitivos, lo que incluye manejar el cultivo bajo un modelo de producción

limpia y buenas prácticas agrícolas. Por esta razón se plantea la alternativa de utilizar extractos vegetales para facilitar el manejo de enfermedades en el cultivo de mora y así se propiciará que el impacto sea menor en el medio ambiente.

El metabolito intermedio presente en el extracto de canela y aparentemente fungistático es el cinamaldehido, por esta razón se desarrolló el presente estudio para comparar su efectividad. Actualmente el cultivo de mora se ha convertido en una de las propuestas productivas más promisorias de la región, conquistando mercados que requieren de productos limpios y con niveles de residualidad de agroquímicos bajos, óptimos para el consumo humano. Por tal razón se planteó esta investigación basada en el uso de extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) como alternativa para el manejo de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

2.1.7.3. Metodología

El aislamiento del patógeno y la obtención del cultivo monospórico del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, se llevó a cabo en el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, de Manizales. La evaluación in vitro del efecto de los diferentes tratamientos sobre el hongo se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal, UNISARC, en el municipio de Santa Rosa de Cabal. Los tratamientos evaluados correspondieron a diferentes concentraciones de extracto de canela al 94% de pureza, un testigo químico utilizando el producto más usado por los agricultores de la región y un testigo absoluto donde se aplicó agua destilada estéril

Aislamiento del Cultivo Puro: para aislar el patógeno se utilizaron muestras de plantas de mora con la sintomatología típica de antracnosis *Collectotrichum gloeosporioides.*

Preparación del Medio de Cultivo y la Adición de las Diferentes Concentraciones del Extracto de Canela y el Score: el medio se preparó con 39 g de Papa Dextrosa Agar (PDA) disuelto en 1000 cc agua destilada estéril bajo punto de ebullición, se llevó al autoclave, luego en la cámara de flujo laminar se revirtió dicho medio con las concentraciones de cada tratamiento de canela y score en las cajas petri con el fin de que no se contaminaran con factores externos.

Prueba de Control *In-Vitro*: en cada caja petri con el medio de cultivo en la parte central se sembró una porción de 0.5 cc de diámetro de cultivo puro *Collectotrichum gloeosporoides Penz* con la ayuda de un sacabocado, posteriormente se sellaron las cajas con cristaflex y se colocaron en un lugar a temperatura ambiente. Se observó el desarrollo del patógeno y el crecimiento radial cada dos días por espacio de 12 días, se hicieron en total seis mediciones. Sobre la base de las cajas petri se trazó un plano cartesiano, con una escala en milímetros, que permitió medir el crecimiento radial de la colonia del hongo C. *gloeosporoides.*

Variables a Evaluar

- Crecimiento radial en milímetros
- Grado de inhibición del crecimiento

Las variables se midieron determinando el crecimiento radial del hongo aplicando la fórmula de πR^2, y el efecto inhibitorio se tomó de la sumatoria del crecimiento radial con respecto al tratamiento testigo.

Análisis de los Datos

Los datos fueron interpretados por medio del análisis de varianza (ANAVA) bajo las pruebas de diferenciación de Duncan, al 5% de confianza. La observación directa fue interpretada a través de la descripción de los fenómenos.

2.1.7.4. Resultados y Discusión

El registro de los datos del crecimiento radial del hongo se hizo de manera acumulada durante las seis mediciones realizadas, pero los datos analizados sólo se tomaron hasta la cuarta medición debido a que en la quinta y sexta medición los registros fueron constantes con respecto a la medición cuatro, como se observa en la tabla 18. El máximo desarrollo del cultivo de *C. gloeosporioides*, en PDA (Papa Dextrosa Agar) se obtuvo sobre el tratamiento 6 (testigo), donde solo se aplicó agua destilada estéril.

Tabla 18. Crecimiento acumulativo del hongo *C. gloeosporioides* a través del tiempo en mm

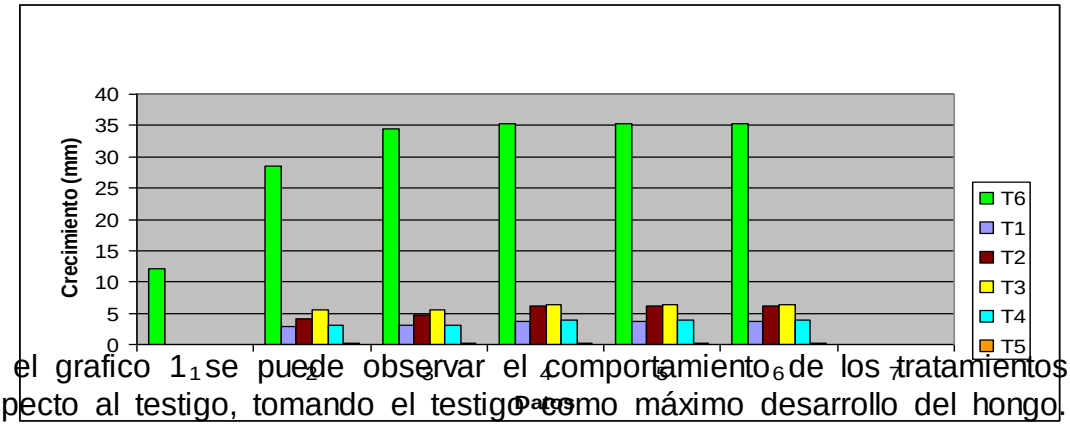
Registros / Tratamientos	**Crecimiento radial del hongo por tratamiento para cada uno de los registros**			
	1	**2**	**3**	**4**
T1	0	2,8	3	3,6
T2	0	4,1	4,8	6,2
T3	0	5,6	5,6	6,3
T4	0	3,1	3,1	3,8
T5	0	0,2	0,2	0,2
T6	12,1	28,6	34,5	35,2

El comportamiento del tratamiento 6 (testigo - agua destilada estéril) dos días después de la siembra del patógeno (primer registro), presentó un crecimiento radial de 12.1 mm correspondiente a un área de (35.1 mm^2), mientras que en los demás tratamientos el desarrollo fue cero (0).

El segundo registro se realizó cuatro días después de la siembra del inóculo y se encontró que en todos los tratamientos se inició el crecimiento de la colonia del hongo, siendo el de menor desarrollo el tratamiento 5 (score) 0.2 mm, seguido del tratamiento 1 (5 ppm de extracto de canela) 2.8 mm, mientras el testigo avanzó rápidamente colonizando gran parte del medio de cultivo 28.6 mm. En el registro 3 realizado seis días después de siembra del inóculo, se pudo observar que el tratamiento 5 (score) inhibió el crecimiento de la colonia del hongo a partir de los cuatro días y así se mantuvo durante todo el tiempo del experimento. En términos generales se encontró que el crecimiento de las colonias solo se dio hasta la medición 3, porque a partir del registro 4 el crecimiento radial para todos los tratamientos (5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm y score), se mantuvo.

Las mediciones se hicieron hasta el registro 6, teniendo en cuenta que los registros 4, 5 y 6 fueron constantes, no habiendo variación en el desarrollo de las colonias, por lo cual se determinó no continuar con la toma de registros, ya que el hongo detuvo su crecimiento dentro del medio de cultivo; es de mencionar que el tratamiento 5 (score) mostró un efecto inhibitorio donde la segunda medición dos días después de la siembra del inoculo se observa que los tratamientos con diferentes concentraciones de canela permitieron el crecimiento de C. *gloeosporoides* hacia el día 8 después de la siembra del inoculo cubriendo un área muy inferior presentada por el tratamiento 6, el cual creció durante los primeros 8 días. Como se observa en la tabla 19, las diferentes concentraciones del extracto de canela al 94% de pureza, produjo un efecto inhibitorio total del micelio del hongo en los primeros dos días de observación. En la segunda toma de datos el hongo comienza a colonizar la caja y detiene su crecimiento en la cuarta toma que corresponde al octavo día. Se presentan datos significativos acerca del efecto antifúngico de la canela para controlar el hongo, puesto que el crecimiento con respecto al testigo fue limitado. Los datos son acumulados para poder determinar el crecimiento radial total del *C. gloeosporioides,* in vitro.

Gráfico 1. Crecimiento radial de *Colletotrichum gloeosporioides* a través del tiempo comparándolo con el testigo.



En el grafico 1 se puede observar el comportamiento de los tratamientos con respecto al testigo, tomando el testigo como máximo desarrollo del hongo. Los tratamientos con las diferentes concentraciones de extracto de canela, muestran que el mayor crecimiento radial se observó en los tratamientos 2 y 3 los cuales

fueron muy similares, pero hay que tener en cuenta que el tratamiento 2 creció más lento que el tratamiento 3 a través del tiempo. La menor tasa de desarrollo de la colonia del hongo se presentó con los tratamientos 1 y 4.

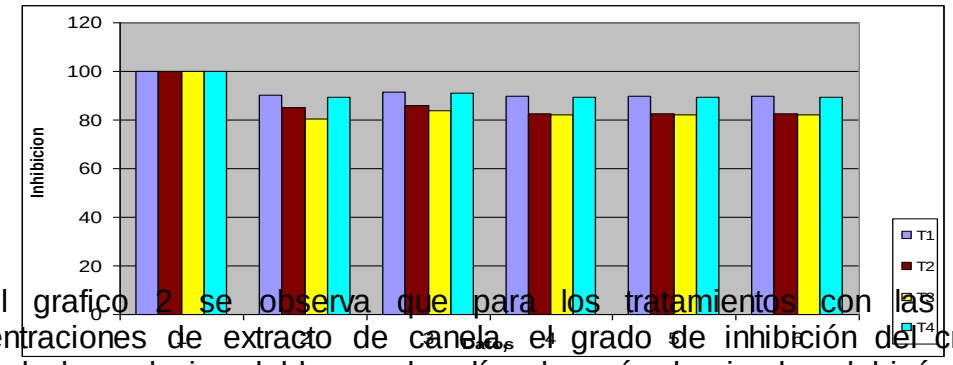
Tabla 19. Efecto del extracto de canela y score en la inhibición del crecimiento radial del hongo *C. gloeosporioides.*

Tratamientos	Porcentaje (%) del efecto inhibitorio del extracto de canela durante cada uno de los registros					
	1	2	3	4	5	6
T1	100	90,2	91,3	89,8	89,8	89,8
T2	100	85,3	86	82,4	82,4	82,4
T3	100	80,4	83,7	82,1	82,1	82,1
T4	100	89,2	91	89,2	89,2	89,2
T5	100	99,3	99,4	99,4	99,4	99,4

Se observa el efecto inhibitorio de los tratamientos con diferentes concentraciones de canela y score respecto al tratamiento testigo (agua destilada estéril), encontrándose que la mayor inhibición se logró con el tratamiento 5 (0.6 cc /l score) con el 99.4% de inhibición, seguido del tratamiento 1 (5 ppm de extracto de canela) con el 89.8% de efecto inhibitorio; el tratamiento 3 (20 ppm de extracto de canela) fue el que menor efecto inhibitorio tuvo sobre Colletotrichum gloeosporioides con el 82.1%.

En términos generales todos los tratamientos tuvieron un efecto inhibitorio para el crecimiento de *C. gloeosporioides.* Para el presente análisis se tomó el crecimiento del tratamiento 6 (testigo) como máximo desarrollo equivalente al 100% y en cada registro se manejaron los datos acumulativos para estimar el porcentaje de inhibición a la fecha y determinar el tratamiento más eficiente.

Gráfico 2. Efecto del extracto de canela en la inhibición del crecimiento radial del hongo *C. gloeosporioides.*

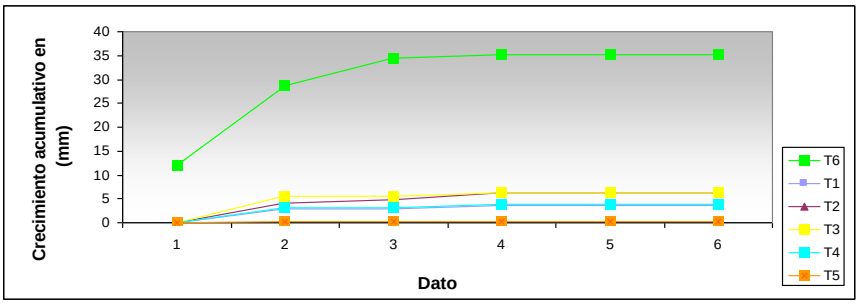


En el grafico 2 se observa que para los tratamientos con las diferentes concentraciones de extracto de canela, el grado de inhibición del crecimiento radial de las colonias del hongo dos días después de siembra del inóculo fue del 100%. En el segundo registro del crecimiento radial del inóculo, que se hizo cuatro

días después de la siembra del mismo, se observa mayor efecto inhibitorio del crecimiento de las colonias en los tratamientos 1 y 4, mientras que los tratamientos 2 y 3 disminuyeron su efecto inhibitorio, siendo de todas maneras alto con respecto al tratamiento 6 (testigo).

Efecto muy similar se observa en la tercera medición que se hizo a los seis días después de siembra, determinándose leve disminución del efecto inhibitorio de los tratamientos con diferentes concentraciones de extracto de canela, pero que aún se sigue considerando alto frente al tratamiento 6. Los registros 4, 5 y 6 presentan valores iguales a los observados en el 3, lo cual da entender que hasta dicha fecha el hongo proveniente de cultivo monospórico tuvo actividad, la cual pudo haber sido restringida por el efecto de los tratamientos de canela y score o que el hongo haya perdido la capacidad de infección dentro del medio de cultivo. En el tratamiento 6 se encontró que la caja petri fue colonizada totalmente al día seis, lo que coincidió con el detenimiento del desarrollo del hongo en los demás tratamientos.

Gráfico 3. Crecimiento radial acumulativo de los tratamientos a través del tiempo.



En la gráfico 3, se integraron los tratamientos para poder mostrar las diferencias en cuanto a crecimiento acumulativo a través del tiempo. El testigo es quien tiene un crecimiento notable por encima de los demás tratamientos y por tal motivo en la investigación se toma como máximo desarrollo para poder comparar los demás tratamientos y así determinar cuál fue el crecimiento radial más significativo y tratamiento con el efecto inhibitorio más eficiente.

2.1.7.5. Conclusiones

Los anteriores resultados permiten concluir que el extracto de canela posee una acción fungicida para el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la antracnosis en mora evaluada *In Vitro*.

Las concentraciones del extracto de canela más eficientes son las de los tratamientos 1 (5 ppm) y la del tratamiento 4 (30 ppm). Por otro lado los tratamientos 2 (10 ppm) y tratamiento 3 (20 ppm) arrojaron buenos resultados en cuanto a inhibición del crecimiento pero no tan eficaces como los anteriormente mencionados.

El desarrollo de las colonias del hongo solo se dio hasta el día seis equivalente al registro 3 en todos los tratamientos, encontrándose que los registros 4, 5 y 6 presentan valores iguales a los observados en el 3, lo cual da entender que hasta dicha fecha el hongo proveniente de cultivo monospórico tuvo actividad, la cual pudo haber sido restringida por el efecto de los tratamientos de canela y score o que el hongo haya perdido la capacidad de infección dentro del medio de cultivo.

En el tratamiento 6 se encontró que la caja petri fue colonizada totalmente al día seis, lo que coincidió con el detenimiento del desarrollo del hongo en los demás tratamientos.

El extracto de canela comparado con un fungicida de síntesis química, llega a ser una alternativa viable de manejo en un programa integrado de enfermedades en este caso *Colletotrichum gloeosporioides*, posicionándose dentro de la normas de producción limpia amigables con el medio ambiente.

2.1.7.6. Recomendaciones

La investigación debe continuar en campo con el fin de determinar el comportamiento de los tratamientos bajo condiciones agroecológicas.

Se deben hacer estudios en campo donde se evalúe el efecto inhibitorio curativo y preventivo del extracto de canela en diferentes concentraciones, además de las propuestas en el presente trabajo.

Se recomienda conocer las especificaciones del extracto de canela en cuanto a pureza y método de obtención para balancear la posología del producto antes de llevar a cabo aplicaciones en campo como alternativa de manejo de *C gloeosporioides*

En necesario conocer muy bien la sintomatología típica del hongo causante de la antracnosis en mora.

La investigación en nuevos productos que puedan servir para el manejo integrado de *C gloeosporioides* debe partir de experiencias de productores o de centros de investigación que trabajan en orientación de desarrollo de técnicas agroecológicas de producción.

2.1.7.7. Bibliografía

AGRIOS, George. 1996. Fitopatología. 2ª ed. México: LIMUSA. 1995. p. 303-334.

CASTRO, D.; O.A., Márquez; V.E., Restrepo y G.I., Vélez. 1995. Evaluación del estado fitosanitario del cultivo de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en el Oriente Antioqueño.

FUNDACIÓN DE FOMENTO AGROPECUARIO BUEN PASTOR - Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Antioquia. 15p. (Serie de Investigaciones 7).

FRANCO, F y ZULETA, J 2006. Guía de Campo para el Manejo de Enfermedades en Mora. Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal "UNISARC". Santa Rosa de Cabal. 20 p.

WILSON, C.L; Solar, Jm. ; El GHAOTH, A. and Wisniewsky, m.e. 1997. Rapid evaluation of extracts and essential oils antifungal activity against Botrytis cinerea. En Plant Diseyse. Vol 81 (2) (Febrero). P. 2004-210.

2.1.8. Selección de material genético promisorio proveniente de programas de mejoramiento, bancos de germoplasma existentes o colectados en campos de agricultores[11].

Objetivo específico (1): *"Con la participación de agricultores, empresas comercializadoras y procesadoras, seleccionar materiales élite de lulo y mora, con criterios de adaptabilidad, resistencia a enfermedades, productividad y aceptación del mercado"*

Objetivo del proyecto (2): *"Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.1.8.1. Marco Referencial

La Corporación Colombiana Agropecuaria, suministró 43 accesiones de la colección de mora, incluida en el Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana, para los procesos de investigación del proyecto. Adicionalmente el CIAT para los trabajos a realizar, exclusivamente en Colombia, empleó 5 clones derivados de hibridación interespecífica, hecha por los investigadores de Corpoica (Lobo, 2006). Se realizó un proceso de caracterización y evaluación morfológicas de la colección, en el cual se encontró el 80% de variantes morfológicas de los atributos cualitativos incluidos en el listado de descriptores y rearreglos de éstos y de las variables cuantitativas entre accesiones. Esto da valor de opción y utilización al germoplasma en conservación.

El cultivo de la mora aún no ha alcanzado un nivel tecnológico que permita productividades y calidades óptimas. Entre los factores que reducen el rendimiento están las enfermedades que atacan el cultivo, de las cuales los patógenos con mayor incidencia y que causan pérdidas considerables son la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), el Moho Gris (*Botrytis cinerea*), el Mildeo Velloso (*Peronospora* spp) y el Mildeo Polvoso (*Oidium* sp) (Cadavid y Rivas, 1994; Castro et al, 1995). Por ello, una alternativa es la búsqueda de materiales con alta productividad, calidad adecuada de las bayas y resistencia a enfermedades.

El Sistema de Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana, a cargo de CORPOICA, posee la colección de *Rubus*, la cual incluye poblaciones cultivadas y espontáneas, colectadas en diversas zonas del país y algunas introducciones de otras áreas del mundo. Esta se ha conformado para conservar la variabilidad del género y promover su utilización, en sistemas productivos, mediante la realización

[11] Lobo Mario. CORPOICA-Colombia

de procesos de valor agregado de diversa índole. A partir de dicha variabilidad y la búsqueda de los atributos señalados, se podrían obtener materiales para suplir las falencias indicadas, como también para apoyar programas de hibridación que buscan combinación de atributos deseados. Por ello, se apoyó la investigación presente con suministro de materiales para la búsqueda de resistencia a patógenos y, se realizaron procesos de valor evaluación y caracterización con la metapoblación en conservación, lo cual traslada los materiales de valor de existencia a valores de opción y utilización. Además, lo anterior permite detectar la ausencia de variabilidad requerida en ésta, para el delineamiento de programas de colecta cuyo norte es la búsqueda específica de ésta.

En Colombia, existen algunos estudios de caracterización de la diversidad genética de mora, tanto morfológica (Zamorano 2004), como molecular usando marcadores RAPDs (Marulanda y Márquez 2001) y micro satélites aleatorios RAMs (del inglés Ramdon Amplified Microsatellite) (Morillo et al 2005). Estos estudios han buscado determinar la similitud entre accesiones evaluadas y origen geográfico de las mismas. Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha estado asociado con identificación de fuentes de resistencia a la antracnosis y otras enfermedades de importancia para la mora de Castilla. En Ecuador por su parte estudios realizados por Romulerux (1996) señalan que existe gran variabilidad genética dentro del género *Rubus*, encontrándose 21 especies diferentes, algunos de estas 7 especies de alta productividad y calidad del fruto.

Marulanda y Márquez (2001) reportan niveles de similitud dentro de la especie *R. glaucus* del orden del 85 a 100%, y una variabilidad genética entre accesiones, asociada con su origen geográfico. Por su parte, los resultados de Morillo et al (2005) permitieron identificar cuatro grupos genéticos diferentes dentro de *R. glaucus*, y uno para cada una de las otras dos especies, *R. urticifolius* y *R. robustus*.

2.1.8.2. Metodología

Los materiales se multiplicaron vegetativamente, en forma inicial, en el C.I. “La Selva” a cargo de Corpoica y luego por la vía de cultivo de tejidos en el laboratorio de la Universidad Católica de Oriente, Rionegro, Antioquia. Estos materiales se entregaron al CIAT mediante una suscripción de Acuerdos de Transferencia de Materiales con fines de investigación. Después se multiplicaron en el laboratorio de dicha entidad por la vía de cultivo de tejidos.

Con apoyo del proyecto, se llevó a cabo un estudio de caracterización y evaluación morfológicas con accesiones de la colección de mora. Para éste se empleó una lista de descriptores morfológicos, correspondientes a variables cualitativas y cuantitativas, las cuales se registraron en 5 plantas por accesión. La información, obtenida a partir de una tesis de grado profesional, se incorporó a medios electrónicos; esto permite elaborar un catálogo, con las modas cualitativas, para facilitar procesos de utilización de los materiales con atributos o combinación de atributos deseados. La caracterización morfológica cualitativa, permitió

identificar que en la colección se encuentran el 80% de los estados de los atributos de ésta índole, lo cual señala variabilidad aceptable en la metapoblación en conservación. Los fenogramas cualitativo, cuantitativo y cualitativo-cuantitativo, indicaron diversidad entre todas las accesiones, la presencia de rearreglos de atributos de las dos categorías, dentro de éstas. Lo anterior sirve para orientar procesos de selección de materiales, búsqueda de estados de los descriptores no presentes en el conjunto de demes de la colección y promoción de la utilización de éstos.

2.1.8.3. Resultados y Discusión

Germoplasma entregado para los procesos de investigación

Se entregaron 43 accesiones de la colección de mora, 5 clones derivados de hibridación interespecífica.El apoyo de proyectos con materiales de los Bancos de Germoplasma, transfiere las poblaciones en conservación de valor de existencia a valor de opción y utilización. Esto permite a los bancos justificar su conformación y existencia y, aprovechar el capital biológico del país en procesos productivos.

Igualmente, la retroalimentación al Sistema de Bancos, promueve el apoyo a éstos y brinda información sobre el potencial del material en conservación para promoción de su empleo en procesos de investigación y fomento.

Procesos de valor agregado: Caracterización y evaluación morfológicas

En los materiales de la colección, se encontró el 80% de los estados incluidos en la lista de descriptores, con polimorfismo interpoblacional en 15 de los 17 atributos estudiados. Las dos características, sin variabilidad fueron el color del cáliz y la forma de la base de la hoja. El fenograma cualitativo, obtenido con variables, generalmente, de heredabilidad alta, señaló la presencia de 3 agrupamientos grandes, con subgrupos en cada uno de ellos y una diferencia máxima del 45% entre materiales, Figura 1, lo que indica rearreglos de los atributos cualitativos entre poblaciones y potencial de encontrar combinaciones de atributos deseados.

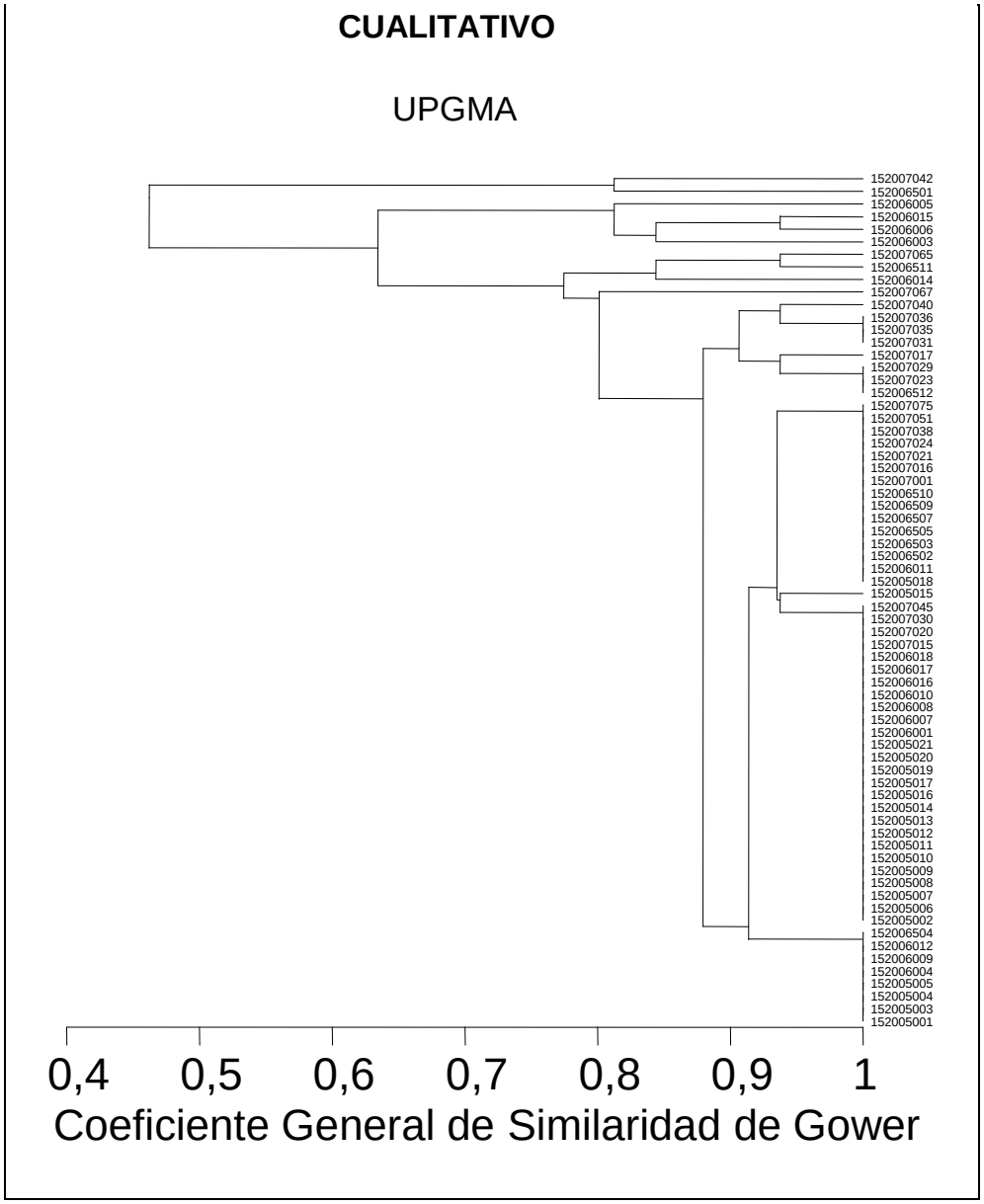


Figura 1. Fenograma de variables cualitativas, de las accesiones de mora (*Rubus sp)* pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, ubicado en el C.I. "La selva" de Corpoica.

Por su parte, como puede apreciarse en la Figura 2, en la cual se presenta el fenograma cuantitativo, todos los materiales difirieron el uno del otro, con agrupamientos a diferente distancia y, con algunos conglomerados de demes con similaridad importante. Esto señala que éstos últimos comparten, muy posiblemente, adaptación a nichos ecológicos similares, si se considera, al analizar la función productiva – Genotipo + Ambiente + Genotipo X Ambiente- que la evaluación se llevó a cabo en la misma localidad. Al respecto, los atributos cuantitativos generalmente están relacionados con valor reproductivo y, por ende, con adaptación. Por ello, materiales que forman conglomerados pueden evaluarse en zonas en la cual se conoce la adaptación de uno o varios de ellos, para buscar

alternativas nuevas de otros que poseen atributos cualitativos deseados por la cadena producción-consumo.

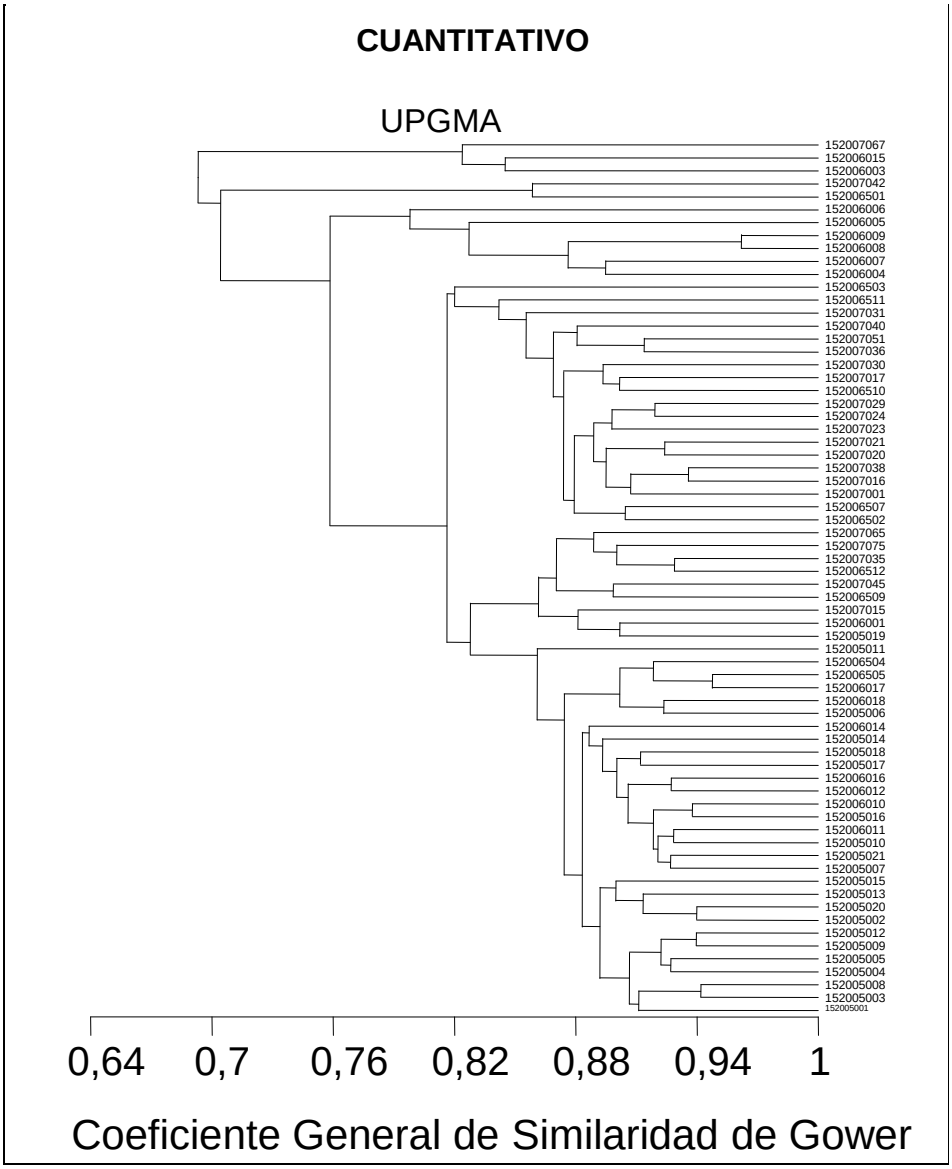


Figura 2. Fenograma de variables cuantitativas, de las accesiones de mora (*Rubus sp)* pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, ubicado en el C.I. "La selva" de Corpoica.

En la Figura 3, se incluye el fenograma cualitativo-cuantitativo, en el cual, al combinar las características cualitativas y cuantitativas, se aprecia una dispersión mayor que la obtenida con cada una de estas categorías, lo cual indica rearreglos a nivel de los conglomerados y, señala potencial de la colección para la búsqueda de materiales con combinación de atributos específicos, o para la identificación de parentales para programas de hibridación, para programas de mejoramiento genético.

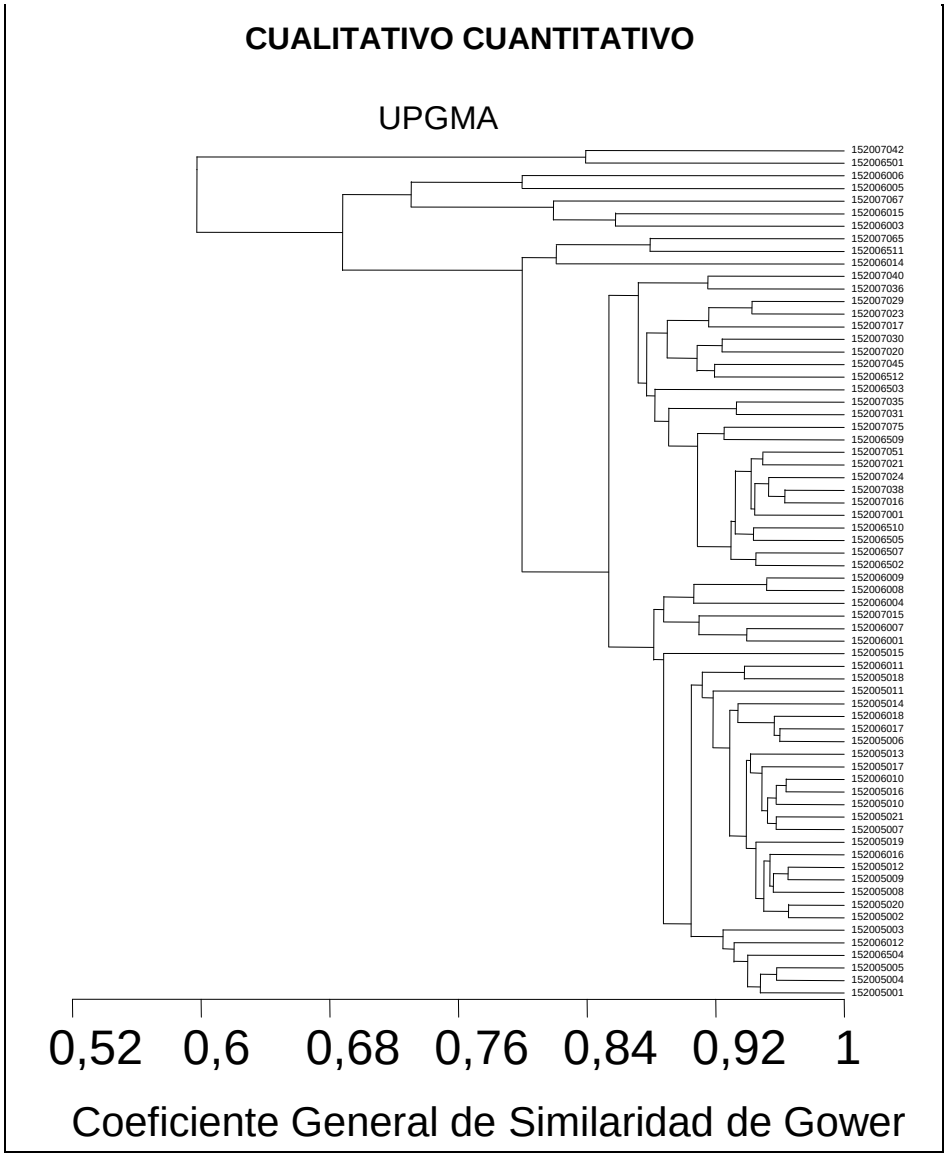


Figura 3. Fenograma de variables cuantitativas y cualitativas, de las accesiones de mora (*Rubus sp)* pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, ubicado en el C.I. "La selva" de Corpoica.

2.1.8.4. Conclusiones

El material suministrado al CIAT, por CORPOICA, apoyó los objetivos de la investigación actual, a nivel de Colombia. Adicionalmente, la retroalimentación sobre los resultados obtenidos da valor de opción y utilización al germoplasma en conservación, objetivo fundamental de las colecciones de variabilidad genética.

La evaluación de clones de lulo, derivados de hibridación interespecífica, desarrollados por Corpoica, complementan procesos de evaluación de ellos y apoyan su entrega como materiales mejorados.

Los procesos de caracterización y evaluación morfológicas, permitieron conocer la variabilidad de ésta índole en la metapoblación de la especie y taxones relacionados y permiten promover su utilización, al igual que determinar necesidades de búsqueda de variantes, de los atributos estudiados, no presentes en el conjunto de demes en mantenimiento. En general, éste tiene una variabilidad aceptable.

2.1.9. Análisis de características físicas, químicas y organolépticas de los frutos de lulo y mora y pruebas de aceptación con la industria y otros mercados (fresco, agroindustria y exportación)[12].

Objetivo del proyecto (4): "*Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados".*

2.1.9.1. Marco Referencial

A través de los estudios de evaluación de variables químicas y organolépticas, se pudo reconfirmar el hecho de que la mora andina *Rubus glaucus*, es ácida, pese a lo cual tiene aceptación en la zona. También se encontró variabilidad para los grados Brix, indicador de azúcares y por ende de sabor dulce, lo que permitió la identificación de accesiones con grados Brix superiores a 7, límite fijado por las procesadoras para la compra de mora, como materia prima. Los valores fluctuaron a lo largo del tiempo de evaluación, con estabilidad diferente a nivel de los demes estudiados. En cuanto a acidez medida como pH, esta no varió mucho entre materiales, con fluctuaciones mayores en algunos de ellos, a lo largo del tiempo de estudio. La acidez medida como ácido málico, exhibió diferencias entre materiales y a lo largo del año; se hará un análisis de factores de clima con mayor efecto en ésta variable, conjuntamente con el planteado para los grados Brix. Para los azúcares totales y reductores, al igual que para los fenoles diméricos, oligoméricos y poliméricos, se encontró variabilidad. Lo anterior, debidamente interpretado con expertos en alimentos y antioxidantes, podría potenciar el uso de la colección de mora, de la Nación Colombiana.

La mora (*Rubus glaucus*), pertenece a un conjunto de especies que se encuentran en la zona templada e igualmente en los Andes. Esta tiene potencial amplio en el mercado nacional y en el internacional (Tafur, *et al*., 2006). Sin embargo, entre los limitantes de la especie, a nivel nacional, se ha incluido el bajo contenido de grados Brix (Franco *et al.*, 2002), aspecto que ha impedido la competitividad de la fruta colombiana para procesos de exportación.

En la colección colombiana de la especie, a cargo de Corpoica, se dispone de información acumulada, en diversos períodos de tiempo, del contenido de grados Brix, registro que se ha tomado sistemáticamente, en las accesiones, luego de que

[12] Lobo Mario-CORPOICA-Cooombia

éstas entran en producción. Esto se hace, luego de que el material comienza la producción de bayas, después de su establecimiento, a través de acciones periódicas de colecta de nuevos materiales. Zamorano *et al* (2007), reportaron, en poblaciones de la fruta obtenidas en los departamentos del Cauca, Nariño y el Valle del Cauca, que algunos de ellas eran sobresalientes por el peso de las bayas, el contenido de grados Brix y una menor densidad de espinas. Esto indica las posibilidades de encontrar demes con un mayor contenido de azúcares, evaluado por los grados Brix. En las accesiones de la colección se han detectado valores que superan los aceptables indicados por las procesadoras de la fruta en el país.

2.1.9.2. Metodología

Con base en los materiales de mora, sembrados en el C.I La Selva, pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, se llevó a cabo un proceso de determinación en 71 accesiones del contenido de grados Brix y la acidez, medida como pH. Las determinaciones se llevaron a cabo en frutos con un estado de desarrollo 4, de acuerdo a la tabla colorimétrica desarrollada por el INCONTEC, para dicha fruta. Los grados Brix se leyeron en un refractómetro de mesa (Milton Roy, Serie 0714051) y el pH de los jugos con un potenciómetro Metrohn (Tipo 1.744.0010).

Se registró la acidez titulable, mediante titulación potenciométrica, a 68 demes con el instrumento indicado en el acápite anterior y, el empleo de fenoftaleina alcohólica, como indicador. También se determinó el contenido de azúcares reductores y totales por los métodos DNS e hidrólisis con ácido sulfúrico respectivamente; compuestos fenólicos por la metodología de Folin Ciocalteu, a través de espectofotometría, con un equipo adquirido en el proyecto (Genesys 10 uv).

Complementariamente, se llevaron a cabo pruebas de palatabilidad de jugos, con 55 accesiones y de jalea con 3 poblaciones, a través de páneles de degustación con probadores no entrenados.

2.1.9.3. Resultados y Discusión

En la Tabla 1, se incluye la información del promedio de grados Brix, obtenido en 61 accesiones, entre el 5 de diciembre de 2007 y el 25 de marzo de 2009 (475 días). Como puede apreciarse hay un conjunto de materiales que superan en promedio, el valor mínimo requerido por las procesadoras del país, 7 grados Brix, con 5 accesiones (ILS 1961, ILS 1863, ILS 1884, ILS 2280, ILS 2281), con valores iguales o superiores a 8. Como puede verse hay fluctuaciones en la variable, en cada uno de los materiales, con obtención de valores máximos en algunas accesiones de 10 y mínimos de 4,4 grados Brix, y desviaciones estándar variables, con base en las fluctuaciones obtenidas en las lecturas en cada una de las poblaciones estudiadas.

La información registrada a lo largo del tiempo indica, de acuerdo con el coeficiente de variación de los valores promedios, dispersión amplia y por ende interacción con el ambiente. Por ello, se utilizará la información obtenida en cada cosecha, para elucidar la los factores ambientales con mayor efecto en la expresión del atributo, conjuntamente con la selección de aquellos con mayor estabilidad y valores más altos de la variable.

Tabla 1. Grados Brix obtenidos con 71 accesiones de mora, registrados en estado de madurez 4 a 5 de acuerdo con la Norma INCONTEC, desde el 5 de diciembre de 2007 hasta el 25 de marzo de 2009. C.I. "La Selva", Rionegro, Antioquia, Colombia.

GENOTIPO	PROMEDIO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
ILS 550	7.16	5.00	9.00	1.02	14.21
ILS 1791	7.87	6.00	10.00	1.01	12.82
ILS 1794	7.00	4.40	9.00	1.16	16.52
ILS 1817	6.11	4.80	7.60	0.82	13.50
ILS 1857	8.11	4.80	9.40	0.84	10.42
ILS 1858	7.87	6.00	9.60	0.89	11.26
ILS 1861	8.00	6.00	9.80	0.69	8.64
ILS 1863	8.19	5.60	9.60	0.78	9.48
ILS 1865	7.00	6.60	7.40	0.32	4.52
ILS 1884	8.15	6.60	9.20	0.60	7.39
ILS 1949	7.26	6.00	8.60	0.84	11.55
ILS 1953	7.15	6.40	8.00	0.49	6.87
ILS 1957	7.50	6.00	9.00	0.84	11.21
ILS 1981	7.41	6.00	9.00	1.02	13.71
ILS 1990	7.49	5.80	8.80	0.77	10.25
ILS 2053	7.52	5.00	9.40	0.83	10.98
ILS 2063	7.60	6.40	8.60	0.60	7.83
ILS 2070	8.40	8.20	8.60	0.28	3.37
ILS 2137	7.48	6.00	9.20	0.91	12.19
ILS 2147	7.39	6.00	9.20	1.00	13.50
ILS 2157	7.79	6.00	9.00	0.91	11.63
ILS 2187	7.31	5.00	9.40	0.92	12.52
ILS 2268	6.96	5.40	8.20	0.67	9.59
ILS 2269	7.98	6.40	9.40	0.70	8.79
ILS 2270	7.84	5.60	10.00	0.94	12.00
ILS 2271	7.71	5.80	9.20	0.73	9.41
ILS 2272	7.34	5.60	9.40	0.84	11.48
ILS 2273	6.64	5.00	8.00	0.82	12.31
ILS 2274	7.49	5.80	9.40	0.81	10.84
ILS 2275	7.56	6.00	9.60	0.82	10.87
ILS 2276	6.67	5.20	8.00	0.68	10.24
ILS 2277	6.70	5.00	8.20	0.67	10.00
ILS 2278	7.09	5.80	8.60	0.73	10.26
ILS 2279	7.44	5.80	9.00	0.84	11.29

ILS 2280	8.41	5.00	9.60	1.11	13.18
ILS 2281	8.10	6.00	10.00	0.91	11.26
ILS 2282	6.80	4.80	8.20	0.64	9.35
ILS 2283	7.92	6.20	9.40	0.79	10.00
ILS 2284	7.05	4.40	9.00	0.91	12.85
ILS 2285	7.12	5.40	9.00	0.76	10.71
ILS 2286	7.58	6.00	9.40	0.75	9.87
ILS 2287	7.22	5.00	9.40	0.86	11.97
ILS 2288	6.80	5.40	8.40	0.78	11.54
ILS 2289	6.71	5.00	8.00	0.95	14.17
ILS 2324 C	6.54	4.40	8.80	0.78	11.95
ILS 2324 S	6.69	5.00	8.20	0.76	11.42
ILS 2353	7.76	6.40	8.80	0.77	9.89
ILS 2360	6.36	4.60	8.40	0.68	10.73
ILS 2361	7.08	5.00	9.20	0.92	12.95
ILS 2362	6.15	4.40	8.00	0.76	12.40
ILS 2364	6.44	5.20	7.40	0.55	8.56
ILS 2365	6.64	5.00	8.60	0.70	10.55
ILS 2366	7.73	5.00	9.40	0.95	12.26
ILS 2367	8.00	6.20	9.40	0.84	10.49
ILS 2368	7.29	5.80	9.80	0.93	12.75
ILS 2369	7.25	6.00	8.20	0.80	10.98
ILS 2370	7.13	4.20	8.40	0.82	11.56
ILS 2372	8.20	8.20	8.20	N-A	N-A
ILS 2373	7.24	5.40	8.60	0.81	11.17
ILS 2375	7.95	5.40	10.80	1.18	14.90
ILS 2376	6.73	5.00	8.40	0.83	12.28
ILS 2377	7.33	6.20	8.60	0.63	8.63
ILS 2429	7.55	6.80	8.60	0.62	8.16
ILS 2442	7.02	5.20	9.00	0.95	13.55
ILS 2443	7.50	5.40	9.00	0.88	11.77
ILS 2445	6.55	5.40	7.40	0.93	14.19
ILS 2447	7.06	6.00	8.00	0.66	9.35
ILS 3399	7.03	5.40	9.20	1.00	14.21
ILS 3400	7.38	5.00	9.20	0.85	11.51
ILS 3401	7.31	4.80	9.00	1.00	13.74
ILS 3402	7.18	5.00	9.20	0.94	13.12
PROMEDIO GENERAL	**7.32**	**4.40**	**10.80**		

Los valores de pH de las 71 accesiones anteriores, se presentan en la Tabla 2. En esta se puede apreciar que la variable es poco afectada por el ambiente y que las diferencias entre accesiones son pequeñas, con alguna respuesta diferencial al período de cosecha, entre accesiones.

Tabla 2. Valores de pH, obtenidos con 71 accesiones de la Colección de la Nación Colombiana de mora, registrados en estado de madurez 4 a 5, de acuerdo con la Norma INCONTEC, desde el 5 diciembre de 2007 hasta el 25 de marzo de 2009, en el C.I. "La Selva", Rionegro, Antioquia, Colombia.

GENOTIPO	PROMEDIO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
ILS 550	2.52	2.29	2.76	0.15	6.07
ILS 1791	2.52	2.27	2.81	0.11	4.29
ILS 1794	2.51	2.26	2.73	0.15	5.88
ILS 1817	2.61	2.32	2.83	0.12	4.42
ILS 1857	2.43	2.26	2.62	0.09	3.79
ILS 1858	2.43	2.18	2.71	0.11	4.51
ILS 1861	2.48	2.15	2.73	0.12	4.64
ILS 1863	2.49	2.33	2.65	0.08	3.07
ILS 1865	2.67	2.36	3.11	0.31	11.66
ILS 1884	2.62	2.26	2.79	0.14	5.22
ILS 1949	2.45	2.34	2.57	0.08	3.30
ILS 1953	2.50	2.20	2.77	0.20	7.97
ILS 1957	2.55	2.34	2.79	0.12	4.63
ILS 1981	2.49	2.34	2.61	0.08	3.39
ILS 1990	2.48	2.28	2.72	0.13	5.33
ILS 2053	2.50	2.34	2.69	0.11	4.29
ILS 2063	2.49	2.21	2.75	0.17	6.88
ILS 2070	2.53	2.41	2.65	0.17	6.71
ILS 2137	2.49	2.26	2.71	0.13	5.35
ILS 2147	2.49	2.18	2.75	0.15	5.97
ILS 2157	2.48	2.28	2.65	0.11	4.42
ILS 2187	2.77	2.43	3.23	0.16	5.90
ILS 2268	2.46	2.26	2.79	0.11	4.37
ILS 2269	2.51	2.24	2.71	0.10	4.04
ILS 2270	2.50	2.25	2.81	0.12	4.86
ILS 2271	2.47	2.23	2.68	0.10	4.20
ILS 2272	2.52	2.26	2.77	0.11	4.37
ILS 2273	2.42	2.23	2.68	0.11	4.52
ILS 2274	2.51	2.17	2.83	0.14	5.41
ILS 2275	2.52	2.28	2.81	0.12	4.82
ILS 2276	2.40	2.15	2.65	0.10	4.32
ILS 2277	2.56	2.32	2.77	0.11	4.31
ILS 2278	2.50	2.27	2.69	0.10	4.13
ILS 2279	2.49	2.20	2.74	0.13	5.23
ILS 2280	2.50	2.36	2.73	0.11	4.23
ILS 2281	2.45	2.18	2.74	0.15	6.03
ILS 2282	2.42	2.25	2.70	0.11	4.61
ILS 2283	2.50	2.27	2.76	0.10	4.16

ILS 2284	2.44	2.21	2.74	0.11	4.40
ILS 2285	2.47	2.29	2.73	0.11	4.26
ILS 2286	2.48	2.21	2.71	0.10	4.16
ILS 2287	2.47	2.23	2.81	0.13	5.23
ILS 2288	2.49	2.28	2.72	0.10	4.04
ILS 2289	2.98	2.60	3.26	0.25	8.34
ILS 2324 C	2.54	2.36	2.76	0.11	4.19
ILS 2324 S	2.62	2.46	2.81	0.11	4.10
ILS 2353	2.58	2.39	2.93	0.18	6.78
ILS 2360	2.36	2.17	2.64	0.10	4.06
ILS 2361	2.46	2.32	2.78	0.12	4.76
ILS 2362	2.40	2.20	2.71	0.12	5.17
ILS 2364	2.36	2.12	2.59	0.09	3.91
ILS 2365	2.46	2.27	2.84	0.12	4.87
ILS 2366	2.46	2.22	2.65	0.11	4.51
ILS 2367	2.51	2.28	2.72	0.11	4.37
ILS 2368	2.46	2.19	2.77	0.12	4.79
ILS 2369	3.40	2.43	3.88	0.37	10.96
ILS 2370	2.55	2.37	2.82	0.11	4.28
ILS 2372	2.41	2.41	2.41	*	*
ILS 2373	2.59	2.37	2.86	0.11	4.08
ILS 2375	2.49	2.30	2.63	0.10	4.14
ILS 2376	2.45	2.21	2.81	0.14	5.62
ILS 2377	2.36	2.13	2.74	0.14	6.06
ILS 2429	2.44	2.22	2.68	0.11	4.60
ILS 2442	2.48	2.19	2.81	0.17	6.85
ILS 2443	2.41	2.17	2.60	0.12	4.85
ILS 2445	2.49	2.35	2.63	0.11	4.60
ILS 2447	2.55	2.34	2.77	0.10	4.09
ILS 3399	2.46	2.24	2.72	0.11	4.49
ILS 3400	2.58	2.17	2.91	0.14	5.26
ILS 3401	2.53	2.23	5.62	0.54	21.32
ILS 3402	2.41	2.17	2.67	0.12	4.98
PROMEDIO GENERAL	**2.51**	**2.12**	**5.62**		

* Una lectura

En la Tabla 3, se incluye la acidez titulable, expresada como ácido málico. Como puede apreciarse hay variaciones en el promedio obtenido en el período de tiempo de registro de la información, cosechas a lo largo de 475 días, lo cual es válido también para los máximos y mínimos, con materiales con diferentes grados de estabilidad en los valores, lo cual se refleja en la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores promedios.

Al igual que en el caso de los grados Brix, se obtendrán modelos que permitan inferir cuál o cuáles de las variables climáticas tienen mayor influencia sobre la expresión de las acidez de las bayas, medida como ácido málico, lo que se

complementa, con la selección de materiales más estables y con los valores deseados para los dos atributos.

Tabla 3. Porcentaje de ácido málico, registrado en 68 accesiones de la Colección de la Nación Colombiana de mora, datos registrados en estado de madurez 4 de la norma INCONTEC, desde el 6 de enero de 2009 hasta el 25 de marzo de 2009, en el C.I. "La Selva", Rionegro, Antioquia, Colombia.

GENOTIPO	PROMEDIO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
ILS 550	3.82	2.95	4.56	0.67	17.54
ILS 1791	3.71	3.22	4.09	0.30	8.06
ILS 1794	3.69	3.15	4.42	0.48	13.14
ILS 1817	2.91	2.35	3.28	0.35	12.04
ILS 1857	4.22	3.15	5.03	0.71	16.76
ILS 1858	4.08	1.27	5.03	1.27	31.26
ILS 1861	3.76	3.35	4.42	0.39	10.41
ILS 1884	4.05	3.22	4.89	1.18	29.22
ILS 1949	4.42	3.48	5.49	1.01	22.88
ILS 1953	3.95	2.88	4.96	0.97	24.48
ILS 1957	4.06	3.35	4.42	0.41	10.09
ILS 1981	4.56	4.15	5.09	0.40	8.87
ILS 1990	3.76	3.22	4.42	0.46	12.10
ILS 2053	3.80	3.22	4.89	0.65	17.09
ILS 2063	3.71	2.95	4.02	0.38	10.16
ILS 2070	4.12	4.09	4.15	0.05	1.15
ILS 2137	4.41	3.48	5.56	0.83	18.87
ILS 2147	4.01	3.28	4.62	0.55	13.82
ILS 2157	4.01	3.89	4.09	0.07	1.83
ILS 2187	2.07	1.54	2.48	0.42	20.10
ILS 2268	3.30	2.61	4.42	0.53	16.00
ILS 2269	3.84	3.55	4.42	0.35	9.04
ILS 2270	3.90	3.05	4.62	0.47	12.05
ILS 2271	4.56	3.69	5.96	0.72	15.80
ILS 2272	3.70	3.15	4.49	0.48	12.95
ILS 2273	3.66	3.15	4.49	0.41	11.16
ILS 2274	3.76	3.15	4.42	0.53	14.12
ILS 2275	4.03	3.48	4.82	0.50	12.32
ILS 2276	4.01	2.88	5.09	0.67	16.81
ILS 2277	3.09	2.75	3.69	0.31	9.93
ILS 2278	3.97	2.68	5.70	0.79	19.97
ILS 2279	3.72	2.48	5.03	0.83	22.44
ILS 2280	3.79	3.69	3.89	0.14	3.75
ILS 2281	4.47	3.28	7.30	1.35	30.10
ILS 2282	4.08	3.62	5.06	0.42	10.36
ILS 2283	3.56	2.01	4.76	0.82	23.06
ILS 2284	3.63	2.81	4.62	0.57	15.72
ILS 2285	3.81	3.35	4.49	0.46	12.03

ILS 2286	3.72	3.02	4.36	0.55	14.69
ILS 2287	4.31	3.42	5.83	1.01	23.47
ILS 2288	3.38	2.95	3.75	0.25	7.27
ILS 2289	1.89	1.61	2.28	0.28	14.71
ILS 2324 S	2.81	2.55	3.08	0.27	9.52
ILS 2324 C	3.12	2.21	3.95	0.57	18.20
ILS 2353	2.22	1.68	3.08	0.49	21.89
ILS 2360	3.92	2.95	4.49	0.57	14.62
ILS 2361	4.10	3.62	4.62	0.34	8.30
ILS 2362	3.63	2.41	4.22	0.54	14.86
ILS 2364	4.13	3.35	5.16	0.58	14.09
ILS 2365	3.58	2.48	4.76	0.76	21.32
ILS 2366	3.91	3.48	4.29	0.32	8.27
ILS 2367	4.00	3.42	5.23	0.64	15.94
ILS 2368	3.92	2.81	5.83	0.89	22.59
ILS 2369	1.64	1.14	3.62	0.82	49.97
ILS 2370	2.68	2.28	3.08	0.29	10.75
ILS 2373	2.97	2.21	4.36	0.68	22.77
ILS 2375	3.75	3.15	4.29	0.57	15.26
ILS 2376	4.13	2.68	6.83	1.42	34.46
ILS 2377	2.55	2.14	2.85	0.26	10.01
ILS 2429	7.24	7.24	7.24	*	*
ILS 2442	3.66	2.95	4.09	0.49	13.48
ILS 2443	4.38	3.75	7.04	0.97	22.15
ILS 2445	3.42	2.61	4.15	0.72	21.18
ILS 2447	3.51	2.75	5.16	1.01	28.86
ILS 3399	3.10	2.01	3.89	0.98	31.45
ILS 3400	3.01	2.58	3.48	0.26	8.81
ILS 3401	3.55	3.15	3.95	0.40	11.32
ILS 3402	3.82	3.82	3.82	*	*
PROMEDIO GENERAL	**3.70**	**1.14**	**7.30**		

* Una lectura

En la Tabla 4, se presentan los valores obtenidos con 39 accesiones de la colección para azúcares reductores y totales y; fenoles de las formas dimérica, oligomérica y polimérica, realizados una cosecha. Como puede apreciarse, en una primera lectura se detectaron diferencias significativas, entre las poblaciones estudiadas, para todas las variables.

Los resultados obtenidos se discutirán con expertos en alimentos y procesamiento, al igual que en tema de antioxidantes, relacionados, estos últimos, con el tema de los fenoles.

Tabla 4. Contenido de azúcares y fenoles, en 39 accesiones de mora, *Rubus sp,* pertenecientes al Banco de Germoplasma de la Nación Colombiana, ubicado en el C.I La Selva de Corpoica.

Accesión*	Azúcares reductores %	Azúcares totales %	Fenoles Forma Dimérica %	Fenoles Forma oligomérica %	Fenoles Forma polimérica %
ILS 2281	3,427 c	4,030 c	0,092 sr	0,117 pqr	0,076 v
ILS 2271	2,951 d	3,950 cd	0,122 jk	0,116 qr	0,098 o
ILS 2278	2,319 ghij	3,750 efg	0,136 h	0,131 jk	0,107 m
ILS 2278	1,518 mnopq	3,280 jk	0,111n	0,123 mn	0,080 u
ILS 2270	5.047 a	5,475 a	0,189 abc	0,144 ef	0,130 h
ILS 2282	1,708 klmno	3,805 def	0,188 bc	0,150 d	0,123 i
ILS 2288	1,043 st	2,585 pq	0113 n	0,108 t	0,105 n
ILS 2286	2,781 def	3,505 hi	0,087 ut	0,118 opqr	0,090 a
ILS 2273	2,027 ijk	3,300 jk	0,194 a	0,132 j	0,113 l
ILS 2287	1,739 klmn	3,065 l	0,185 c	0,148 ed	0,134 g
ILS 2269	2,964 d	3,735 fg	0,089 t	0,115 qr	0,86 sr
ILS 2275	0,922 tuv	2,640 opq	0,083 v	0,12 mno	0,092 q
ILS 2277	1,084 rst	2,280 r	0,122 jk	0,133 ij	0,86 sr
ILS 1817	1,966 jkl	3,295 jk	0,093 sr	0,111 st	0,106 mn
ILS 2360	1,472 nopq	2,800 mn	0,085 uv	0,095 v	0,082 t
ILS 2362	1,309 qrs	2,565 q	0,121 jkl	0,117 opqr	0,096 p
ILS 2364	0,975 tu	2,580 q	0114 mn	0,127 jk	0,138 f
ILS 2187	2,387 fghi	4,495 b	0,191ab	0,197 a	0,197 a
ILS 3399	1,418 opq	2,725 nop	0,136 h	0,109 t	0,136 f
ILS 2370	2,614 defg	3,660 fgh	0,143 f	0,169 b	0,150 e
ILS 2377	2,964 d	4,415 b	0,097 pq	0,082 w	0,116
ILS 2366	2,212 hij	3,610 gh	0,077 w	0,101 u	0,087 r
ILS 2361	1,433 nopq	3,250 k	0,095 qr	0,116 qr	0,076 v
ILS 2365	0,712 v	1,995 s	0,123 ijk	0,127 kl	0,124 i
ILS 3400	2,396 fghi	3,415 ij	0,150 e	0,139 gh	0,161 c
ILS 1814	1,253 qrs	3,900 cde	0,141 fg	0,117 pqr	0,154 d
ILS 1953	2,162 hij	3,340 jk	0,137 gh	0,095 v	0,068 w
ILS 1957	1,320 pqr	2,735 no	0,107 o	0,125 lm	0,108 m
ILS 1990	2,809 de	3,560 hi	0,111 n	0,114 rs	0,085 s
ILS 2053	2,419 efgh	3,735 fg	0,172 d	0,142 fg	0,169 b
ILS 2137	0,768 uv	1,720 t	0.090 st	0,095 v	0,100 o
ILS 2147	1,805 klm	2,845 mn	0,126 i	0,108 t	0,084 s
ILS 2157	1,253 qrs	3,060 l	0,118 lm	0,102 u	0,115 kl
ILS 2443	1,623 lmnop	2,765 no	0,100 p	0,119 nopq	0,098 o
ILS 2447	2,167 hij	3,725 fg	0113 n	0,121 nop	0,115 k
ILS 2343	3.922 b	4,365 b	0,085 uv	0,103 u	0,091 q
ILS 550	3,631 bc	4,340 b	0,125 ij	0,136 hi	0,118 j
ILS 2324	1,691 klmno	2,925 lm	0,126 i	0.109 t	0,129 h
ILS 2289	0,923 tuv	3,810 def	0,120 kl	0,162 c	0,134 g

*Entre promedios marcados con diferente letra en cada columna, hay diferencias altamente significativas (prueba de Student con 95% confiabilidad).

En la Tabla 5, se aprecian los valores modales de la calificación de apariencia, aroma, sabor, dulce y acidez, obtenidos con jugos de 51 accesiones de la colección de mora. En general hubo aceptación por los materiales, con algunas excepciones; la evaluación se realizó con repeticiones en el tiempo. En la Tabla 7, se describen los resultados obtenidos con una prueba de degustación con 3 materiales. Los resultados obtenidos con la evaluación de los jugos, realizados en

forma repetida con los probadores, son un indicativo de la aceptación de la fruta para la finalidad indicada y sirven, como factor adicional, para la selección de los materiales de la colección, conjuntamente con otros atributos cualitativos y cuantitativos deseables. Lo obtenido con la prueba de palatabilidad de la jalea de mora, requiere completarse con el resto de acciones, con evaluaciones repetidas en el tiempo. Esto no ha continuado por un soqueo sanitario hecho con las plantas de la colección, las cuales han rebrotado y se encuentran en fase vegetativa algunas y otras en inicio de la etapa reproductiva.

Tabla 5. Calificativos modales obtenidos en pruebas de palatabilidad de jugo de mora, de 51 genotipos de mora evaluados, durante los años 2008 y 2009, en el C.I La Selva, Rionegro, Antioquia.

GENOTIPO	APARIENCIA	AROMA	SABOR	DULCE	ACIDEZ
ILS 1791	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 1817	Le desagradó mucho	No le gustó ni le desagradó	Le desagradó ligeramente	Poco dulce	Poco ácido
ILS 1857	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 1858	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 1861	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Ácido
ILS 1863	Le desagradó ligeramente	No le gustó ni le desagradó	Le gustó moderadamente	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 1981	Le gustó mucho	Le gustó ligeramente	Le gustó ligeramente	Dulce	Poco ácido
ILS 2053	Le gustó mucho	Le gustó ligeramente	Le gustó moderadamente	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2063	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2147	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2187	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Medianamente ácido
ILS 2268	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Poco ácido
ILS 2269	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Poco ácido
ILS 2270	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 2271	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2272	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 2273	Le gustó moderadamente	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2274	No le gustó ni le desagradó	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Dulce	Medianamente ácido
ILS 2275	Le gustó mucho	No le gustó ni le desagradó	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido

ILS 2276	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2276	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2277	Le gustó mucho	Le gustó ligeramente	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2278	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 2279	Gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2280	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Ácido
ILS 2281	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Medianamente ácido
ILS 2282	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2283	Le desagradó mucho	No le gustó ni le desagradó	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 2284	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2285	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2286	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2287	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Poco ácido
ILS 2288	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2360	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Poco ácido
ILS 2361	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2362	Le gustó moderadamente	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Poco dulce	Medianamente ácido
ILS 2364	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Medianamente dulce	Medianamente ácido
ILS 2365	Le gustó mucho	Le gustó ligeramente	Le gustó moderadamente	Dulce	Poco ácido
ILS 2366	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2367	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 2368	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Medianamente ácido
ILS 2369	Le desagradó extremadamente	No le gustó ni le desagradó	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2370	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2373	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 2376	No le gustó ni le desagradó	No le gustó ni le desagradó	Le gustó moderadamente	Poco dulce	Medianamente ácido
ILS 2377	Le gustó mucho	No le gustó ni le desagradó	Le gustó ligeramente	Dulce	Poco ácido
ILS 2447	Le gustó mucho	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 3399	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	Poco ácido
ILS 3400	Le gustó moderadamente	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 3401	Le desagradó ligeramente	Le desagradó ligeramente	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido
ILS 3402	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Dulce	Poco ácido

Tabla 6. Modas obtenidas en una prueba de palatabilidad de jalea de mora. “C.I La Selva”, Rionegro, Antioquia.

GENOTIPO	CONSISTENCIA	AROMA	SABOR	DULCE	ACIDEZ
ILS 2271	Blanda	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	No ácida
ILS 2278	Sólida	No le gustó ni le desagradó	Le gustó mucho	Poco dulce	No ácida
ILS 2287	Sólida	Le gustó mucho	Le gustó mucho	Poco dulce	No ácida

2.1.9.4. Conclusiones

En la colección de mora hay materiales con un contenido de grados Brix superior a 7, límite inferior fijado, por las procesadoras, para la compra de la fruta con destino a elaboración de productos.

Los grados Brix varían, en forma diferencial, en cada material a lo largo del tiempo, esto permitir realizar la selección de materiales con mayor estabilidad.

El resultado anterior indica un efecto de factores de clima sobre la variable, por ello se debe elucidar cuál o cuáles de éstos inciden en la baja de los grados Brix, para diseñar prácticas que puedan mitigar el efecto.

La acidez medida como pH, no exhibió diferencias considerables entre materiales, pero si en el mismo material a lo largo del tiempo, con diferencias en la fluctuación entre las accesiones estudiadas.

La acidez, medida como ácido málico, exhibió un patrón similar entre materiales y a lo largo de las evaluaciones, por lo cual es conveniente seleccionar materiales con la menor acidez y determinar el efecto de componentes del clima en las oscilaciones en la expresión del atributo a nivel de los materiales.

Se detectó también polimorfismo entre poblaciones para el contenido de azúcares totales y reductores y para las formas dimérica, oligomérica y polimérica de fenoles. Esto debe analizarse con expertos en nutrición y antioxidantes, para conocer el potencial de los demes estudiados, en este sentido.

2.1.10. Análisis de la diversidad genetica de la mora cultivada (*Rubus glaucus* benth) y especies emparentadas en zonas productivas del ecuador mediante marcadores moleculares[13]

Objetivo del Proyecto (2): *Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia*

[13] Garrido P[1]., Vásquez W[2]. y Morillo E[1]

[1] INIAP. Departamento Nacional de Biotecnología. EESC, Quito, Pichincha, Ecuador. Mail: biotec@rdyec.com

[2] INIAP. Programa Nacional de Fruticultura. Granja Experimental. Tumbaco, Pichincha Ecuador. w ilovasquez@yahoo.com:

2.1.10.1. Marco Referencial

A pesar de la importancia local y regional de la mora de castilla (*Rubus glaucus*), estudios relacionados al conocimiento de la base genética del cultivo en el Ecuador es limitada. Este estudio analizó la diversidad genética de 108 accesiones de mora cultivada y especies emparentadas, provenientes de las provincias de Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, y Loja, incluyendo muestras de accesiones colombianas conservadas por el INIAP. Se utilizaron 107 primers RAPDs y 72 primers ISSRs para realizar un sondeo de la diversidad e identificar marcadores útiles para la identificacion de polimorfismos genético. Sin embargo los resultados obtenidos con estos marcadores sugieren una reducida base genética de *R. glaucus*, identificándose solamente un primer ISSR polimórfico. El empleo de marcadores AFLPs, mediante el método M13-tailing en un secuenciador LI-COR 4300S, permitió caracterizar de manera más fina la diversidad de *R. glaucus*. Inicialmente se probaron 32 combinaciones AFLPs, de las cuales se seleccionaron cinco combinaciones polimórficas.

Del total de muestras analizadas, (21 de *Rubus glaucus,* 1 variedad brazos, 1 variedad Olallie y 6 especies silvestres emparentadas) los AFLPs corroboran la reducida base genética de *R. glaucus*, detectándose sin embargo, la existencia de una estructura genética entre el material cultivado con la conformación robusta de dos grupos de accesiones, uno de los cuales está formado únicamente por materiales ecuatorianos, mientras que el segundo, incluye a tres accesiones colombianas y a las variedades sin espinas recientemente promocionadas. Los análisis estadísticos realizados (bootstrap, PCO y AMOVA) corroboran la robustez de esta diferenciación genética. Este resultado es importante en materia de mejoramiento genético de la mora. A corto plazo será importante disponer de la información morfoagronómica de los materiales y de realizar análisis moleculares complementarios que permitan determinar el origen de esta divergencia genética.

2.1.10.2. Metodología

Se colectaron 108 accesiones muestreadas en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Loja, de las cuales 78 se encontraron en estado cultivado y 30 en estado silvestre. Las plantas cultivadas se identificaron a priori como *Rubus glaucus* mientras que entre las plantas silvestres se identificaron como *R. urticifolious, R. niveus, R. robustus, R. roseous, R. compactus, R. acanthophyllos, R. coriaceus, R laegardii, R. nubigenus, R. loxensis.* El número de plantas muestreadas corresponden a: 41 en Tungurahua, 19 en Bolívar, 10 en Cotopaxi, 7 en Loja y 31 accesiones provenientes de la colección del programa de Fruticultura-Granja Experimental Tumbaco del INIAP, de origen colombiano y Pichincha. La variabilidad de la mora cultivada incluye 32 accesiones de la variedad negra fruto grande, 6 de fruto rojo grande, 2 de fruto rojo pequeño, 1 de fruto negro pequeña, además se identificaron 19 accesiones de planta pequeña y 8 accesiones que no poseen espinas. Estos materiales son actualmente conservados ex situ por el programa de Fruticultura del INIAP.

Sondeo de la diversidad con marcadores RAPDs e ISSRs

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo de Khanuja *et al*. (1999), que resultó el más efectivo que se realiza a partir de muestras foliares deshidratadas con silicagel. Se evaluaron 107 primers RAPDs y 72 primers ISSRs en 16 muestras de ADN de 5 variedades de *R. glaucus* y especies emparentadas. Los primeros seleccionados fueron con base al nivel de información y calidad de amplificación para el genotipaje de 10 muestras disponibles. El coctel de amplificación utilizado fue similar para ambos tipos de marcadores, con la única variante del primer respectivo [0.2 uM]. Las reacciones de amplificación fueron efectuadas en un volumen final de 6.9 *u*l, con 5 [ng/μl] de ADN genómico, primer [1,0 μM], buffer de reacción 5X, dNTPs [2.5 mM], y 5 unidades de *Taq* polimerasa. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó por 3 horas a 120 V. El peso molecular de los polimorfismos se estimó tomando como referencia el marcador *1Kb DNA Ladder* (10381-010 INVITROGEN) y el programa LENGHT-III (Templeton y Lawrence, 1988).

Genotipaje con marcadores AFLPs

Debido a la alta calidad y cantidad de ADN que se requiere para una adecuada digestión, la extracción de ADN se realizó utilizando un método comercial de columnas (*PureLink Plant Total DNA Purification Kit*, INVITROGEN Cat. No.), Se utilizó una variante del protocolo original de AFLP basada en el método M13-Tailing (Myburg & Remington 1999) y aplicada al secuenciador LI-COR® 4300S con el kit comercial *IRDye Fluorescent AFLP kit for large Plant Genome Analysis* (*LI-COR,* Cat. No.). Los productos de la digestión se reconocieron en geles de agarosa al 2% para la verificación de que existió una restricción total de cada muestra de ADN. Se probaron 32 combinaciones de primers con ADN de cuatro variedades de *R. glaucus*, y posteriormente las combinaciones de AFLPs seleccionadas, para estose utilizo el genotipaje de 21 muestras de *R. glaucus*. Las imágenes del gel se generó por el LI-COR y que fueron leidas en el asistente de lectura SAGA MX - AFLP® (IR2; *LI-COR* Biosciences).

Análisis estadístico

Las tres metodologías antes descritas son de tipo dominante y se analizan como datos binarios, es decir ausencia o presencia de polimorfismos entre muestras. En la lectura se evitó el registro de datos dudosos o ambiguos, considerándose un polimorfismo a una banda presente en al menos dos muestras de ADN de accesiones distintas. La base de datos binarios se importó al programa, NTSYS ver. 2.20 (Rohlf, 2002) para el cálculo de una matriz de similitud genética con el coeficiente de Jaccard. Sobre la matriz obtenida se aplicó la técnica de agrupamiento o *Cluster Analysis,* empleando el método UPGMA. Con el mismo paquete estadístico se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCO) el

cual proyecta a las muestras en función de porcentajes de varianza explicados por cada coordenada o eje en un plano bi o tridimensional (x, y o z). Se realizó además un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el macro para EXCEL GenALEx ver. 6 (Peakall y Smousse, 2001), que calcula el parámetro PhiPt (muestra la proporción de la varianza entre las poblaciones, relativa a la variación total) y las distancias genéticas de Nei entre grupos predefinidos. Finalmente se realizó un análisis de remuestreos "bootstrap" el cual estima la robustez estadística del o los agrupamientos obtenidos, empleando el programa PAUP v. 4.0 (Swofford, 2000). Esto se realizó con 1000 réplicas usando la opción "Mean Character Difference" y el método UPGMA.

2.1.10.3. Resultados y discusión

Diversidad genética de R. glaucus y especies emparentadas revelada por marcadores RAPDs e ISSRs

Los 107 primers RAPDs probados no revelaron la presencia de polimorfismo en *R. glaucus* sino solamente a nivel interespecífico con las especies emparentadas (Fig. 70). Similares resultados se obtuvieron con los 72 primers ISSRs probados a excepción del primer ISSR-872 que reveló alta información por la cantidad de polimorfismo detectado en *R. glaucus,* siendo por lo tanto el que se utiliza para caracterizar las 93 accesiones disponibles (*R. glaucus* y especies emparentadas) (Fig.71). La amplificación de las bandas tuvieron un rango entre 360pb a 3030pb.Se determinó un total de 16 fragmentos ISSR, de las cuales 13 resultaron polimórficas en el material analizado. De estas, 9 resultaron polimórficas en las muestras de *R. glaucus*. Con esta información se determinaron duplicados obteniéndose 52 % de clones de un total de 68 muestras de *R. glaucus* analizadas.

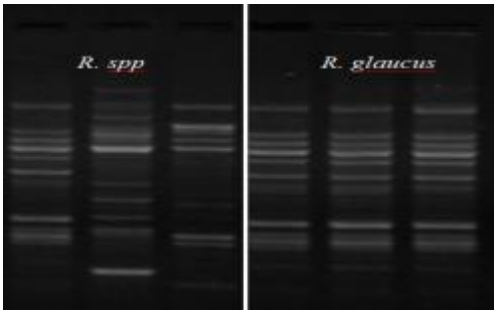


Figura 70.Patrones de amplificación con el primer OPAM – 18, en tres muestra de *R. glaucus* y tres *R. spp.*

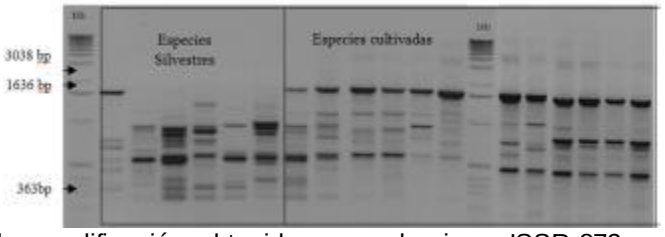


Figura 71.Patrones de amplificación obtenidos con el primer ISSR-872 en 18 muestras de *R. glaucus* y especies emparentadas. Con flechas se indican algunos de los polimorfismos detectados y evaluados.

Estructura genética revelada por los marcadores AFLPs

Del screening o sondeo realizado (Fig. 72) se seleccionaron cinco combinaciones AFLPs (E-ACG/M-CTG, E-ACC/M-CTT, E-AGC/M-CTC, E-AAC/M-CAT y E-ACC/M-CTC) para la caracterización de material de *R. glaucus*, se seleccionó 21 accesiones con la información proveída por el primer ISSR-872. A estas se adicionaron muestras de la variedad brazos (1), Ollalie (1) y especies emparentadas (6). El genotipaje de las 29 muestras con las cinco combinaciones de AFLPs seleccionadas, se registró un total de 203 polimorfismos cuyo peso molecular osciló entre 100 a 350pb, resultando en promedio 77% de polimorfismo. Patrones de amplificación obtenidos con la combinación E-ACG/M-CTG se muestran en la figura 73.

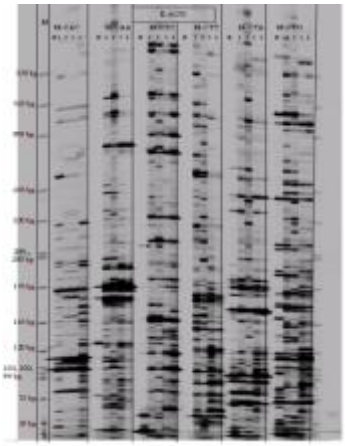


Figura 72.Patrones de amplificación AFLP en 800 en obtenidos de un screening con 4 muestras de *R.glaucus* con las combinaciones: E-ACG /M-CAC, M-CAA, M-CTC, M-CTT, M-CTA, MCTG.

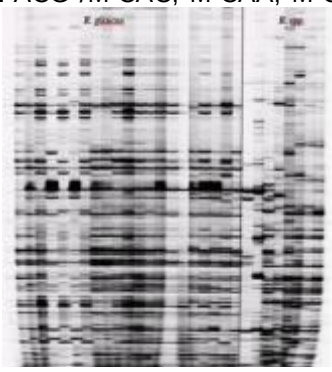


Figura 73. Reacción revelada por AFLP, con la combinación E-ACG/ M-CTG marcada en 800nm.

Estructura genética de R. glaucus

El dendograma del polimorfismo AFLP e ISSR (Figura 74), muestra la conformación de dos grupos identificados con las letras A y B a un nivel de disimilitud genética del 0.39. El grupo A incluye a las accesiones cultivadas, es decir *R. glaucus*, mientras que el grupo B comprende a las especies silvestres emparentadas e incluyen también a la variedad brazos. El grupo A, presenta dos subgrupos identificados como C1 y C2, a una distancia de disimilitud de 0.50. El subgrupo C1 incluye a tres accesiones colombianas y a las accesiones sin espinas, mientras que el subgrupo C2 está conformado por accesiones ecuatorianas. La robustez del subgrupo C2 se ve sustentada por un valor bootstrap de 91. De la misma manera el PCO (Fig. 75) muestra la estructuración genética en dos subgrupos dentro de *R. glaucus,* esto apoya los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento UPGMA y ayuda a diferenciar claramente los grupos C1, C2 y W.

La Figura 75, representa la dispersión de 29 accesiones de *Rubus* en función de los dos primeros ejes de coordenadas que extraen el 28% de la varianza total observada. El primer eje de varianza distingue en los dos polos de la coordenada al subgrupo C1 de *R. glaucus* perteneciente al grupo de silvestres, mientras que el subgrupo C2 de *R. glaucus* se ve diferenciado por la segunda coordenada que extrae 12% de la de varianza total. Las distancias genéticas de Nei que se observan entre los dos subgrupos de *R. glaucus* y las especies silvestres, esto confirma la mayor diferenciación del subgrupo C1 respecto al grupo de silvestres que el subgrupo C2, siendo este último más afín con el grupo B.

Por otro lado, el AMOVA realizado para los tres grupos del Clúster análisis determina un valor de ΦPT de 0,35 (p = 0,001), resultado que indica que el 35% de la variación genética contribuye a la diferenciación entre grupos (C1, C2 y B), mientras que el 65% de variación restante se distribuye dentro de cada grupo. Estos resultados sugieren una alta diferenciación genética entre los dos subgrupos de *R. glaucus* y el grupo de especies silvestres emparentadas.

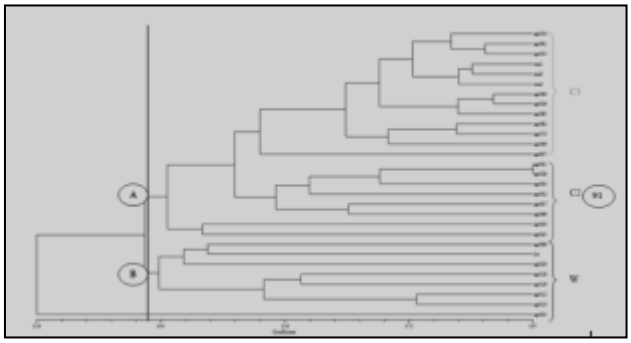


Figura 74. Árbol UPGMA con base en 13 polimorfismos ISSR y 152 AFLPs, de 29 entradas del género *Rubus*.

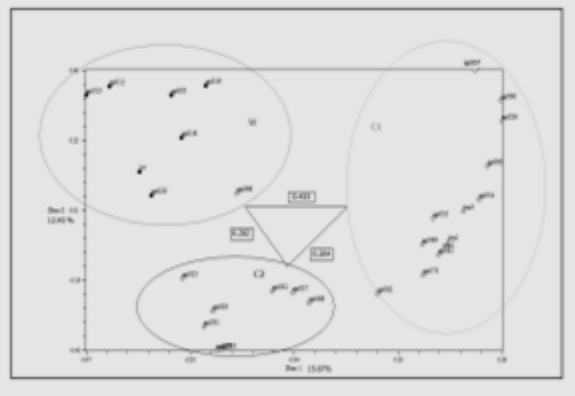


Figura 75. Diagrama de PCO que muestra la distribución en el plano definido por las dos primeras coordenadas que extraen un 27% de la variación genética observada con marcadores AFLPs.

De un total de 189 primers aleatorios probados (107 RAPDs y 72 ISSR) en 13 muestras de ADN extraídos de diferentes accesiones o morfotipos de *R*. *glaucus*, no se detectaron polimorfismos excepto con el primer ISSR-872. Este resultado corrobora la limitada base genética de la mora de castilla en el presente estudio. Este resultado podría explicarse por el régimen reproductivo del cultivo de mora, descrito como apomíctica facultativa; régimen en el cual las plantas provenientes de semilla botánica son producidas asexualmente por pseudogamia, que tienen baja diversidad genética (Kollmann *et al.,* 2000), además de la reproducción asexual o vegetativa empleado por los agricultores tradicionales (Marulanda y Márquez, 2001).

La utilización de marcadores altamente resolutivos como los AFLPs (Cenis, 2005) en genotipos estrechamente relacionados s, permitió identificar dos grupos bien conformados genéticamente en *R. glaucus* , esto fue corroborado por los análisis estadísticos realizados. Esta estructura podría tener su origen en la introgresión genética, producto de la recombinación sexual, donde incluso los bajos niveles de germinación? pueden ser suficiente para mantener la variabilidad genética en una población predominantemente apomíctica (Kollmann *et al.,* 2000). También podría estar relacionado con el nivel de ploidia de la especie, ya que el género *Rubus* posee una amplia plasticidad de formas de reproducción, las cuales están ligadas directamente con el nivel de ploidia de la especie: plantas diplodes poseen reproducción sexual mientras que especies poliploides son apomícticas, seudógamas y autofértiles (Antonius y Nybon., 1995).

Con la información actual no es posible determinar con certeza el origen de esta divergencia en *R. glaucus*, siendo necesarios necesario un análisis complementario de ADN cloroplástico, conteo de cromosomas y caracterización fenotípica, que aportaran al esclarecimiento de su origen y las implicaciones directas en materia de fitomejoramiento de la mora de castilla, que permitan la selección de progenitores altamente diferenciados.

2.1.10.4. Conclusiones

- El análisis molecular determina que en Ecuador se cultivaría únicamente la especie *Rubus glaucus,* Las especies silvestres con posible potencial agronómico, no sustantivamente representadas en este estudio, no están cultivadas por los agricultores.
- Las técnicas de RAPDs, no revelo polimorfismos a nivel intraespecífico en *R. glaucus*, aunque si a nivel interespecífico. Con los ISSRs se identificó un primer altamente informativo (Primer 872) para la detección de duplicados. En cambio los AFLPs fueron más resolutivos en la detección de diversidad, revelando diferencias entre todas las 21 muestras de *R. glaucus* analizadas
- Los RAPDs e ISSR muestran que *Rubus glaucus* presenta una baja variabilidad genética en Ecuador. Se determinó un 52% de duplicados en el material estudiado.
- Los AFLPs e ISSR revelaron la existencia de dos grupos genéticamente bien conformados en *R. glaucus,* uno de los cuales está formado por materiales ecuatorianos, mientras que el segundo grupo incluye a tres accesiones colombianas y a las accesiones sin espinas recientemente identificadas.
- El origen de la estructura genética en *R. glaucus* es desconocido, se recomienda complementar este estudio con el conteo de cromosomas, Análisis de cloroplástico y caracterización morfoagronómica.

2.1.10.5. Bibliografía

Antonius, K., y Nybom, H. (1995).Discrimination between sexual recombination and apomixidautomixis in a *Rubus* plant breeding programme. Department of Plant BiologylPlant Breeding, University of Helsinki, Finland. Balsgrd-Departrment of Horticultural Plant Breeding, Swedish University of Agricultural Sciences, *Hereditas* 123: 205-213.

Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M & Kumar, S. 1999. Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secundary Metabolites Essential Oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7.

Lobo, M. & Medina, C. (2000). Lulo (*Solanum quitoense* Lam). En: Caracterizaçao de Frutas Nativas da America Latina. Serie Frutas Nativas. Ediçao comemorativa do 30 ° aniversario da Sociedade Brasileira de Fruticultura. p. 1-43.

Templeton A & Lawrence J (1988). FRAG-LENGHT III: Algorithm for the calculation of molecular weights. Software distributed by the authors.

Waugh, R., Van de Ven, Phillips, M., Powell, W. (1990). Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by Southern hybridization. *Plant Systematics and Evolution* 172: 65–75.

2.1.11. Desarrollo de un programa de manejo integrado de botritis (*Botrytis cinerea)* en mora de castilla (*Rubus glaucus b.)*, en Bolívar y Tungurahua[14].

Objetivo del Proyecto (3): "*Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.1.11.1. Objetivos

Objetivo general

Sincronizar el uso de fungicidas con el manejo agronómico, manejo sanitario para interferir de manera estratégica en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad, lo que permitirá realizar un control más racional de *B. cinerea*.

Objetivos específicos

- Establecer el desarrollo epidemiológico de la enfermedad en función de desarrollo fenológico de la planta.
- Evaluar el efecto *in vitro* sobre el desarrollo micelial de *Botrytis cinerea* de fungicidas que se comercializan en Ecuador.
- Evaluar en campo la eficacia de los fungicidas que más retardan el desarrollo micelial del patógeno.
- Evaluar diferentes estrategias sincronizadas de manejo entre el uso de fungicidas, desarrollo epidemiológico, manejo agronómico y sanitario del cultivo.
- Validar un programa de manejo integrado de *Botrytis cinerea* en mora en Chillanes y Pillaro.

2.1.11.2. Marco Referencial

La mora de castilla (*Rubus glaucus* BENTH) es una fruta de consumo diario de las familias ecuatorianas, por lo que la demanda es alta (2 kilos/familia/semana), especialmente en la región costa. El área de cultivo en el país es 5.247 ha (INEC 2003). Los rendimientos obtenidos manejándola técnicamente de acuerdo a sus estados fenológicos llega a 12-15 Kg/planta por año, mientras que los agricultores obtienen promedios de 5 Kg/planta por año, considerando 1666 plantas por hectárea con una densidad de plantación de 2m x 3 m. El desconocimiento en cuanto a manejo o técnicas de cultivo impide que se obtenga producciones representativas del potencial de la fruta. La principal razón de los bajos niveles de rendimiento es el ataque de enfermedades, lo que además está directamente

---

[14] Villares M.[1], Martínez A.[1], Ochoa J.[2], Asaquibay C.[2], Gallegos P.[2], Vásquez W.[3]
[1] Programa de Fruticultura Zona Centro del INIAP
[2] Departamento de Protección Vegetal del INIAP
[3] Programa Nacional de Fruticultura del INIAP

asociado con la mala nutrición de la planta y mal manejo de podas. La enfermedades más importantes del cultivo de mora son la botritis causada por *Botrytis cinerea*, mildeo causada por *Peronospora sp*, oidio causado por *Oidium sp*., muerte descendente causado por *Verticillium, sp.* Botritis y mildeo son importantes en zonas húmedas o altas (en Tungurahua desde los 2700 a 3500 m.s.n.m), mientras que oidio es importante en zonas secas o bajas (en Tungurahua desde los 2400 a 2700 m.s.n.m).

En la provincia Bolívar, el cultivo de mora se encuentra seriamente afectado por la pudrición del fruto (*Botrytis cinérea*) que reduce significativamente el rendimiento de la fruta e incluso en meses de invierno como enero, febrero y marzo en varias zonas de Chillanes los productores no obtienen producción. Las condiciones extremas de precipitación (1200 mm al año) y humedad (75%) favorece a la rápida proliferación de la enfermedad haciendo aún más difícil el control. El agricultor realiza el control de enfermedades utilizando protocolos de aplicación de pesticidas recomendados por casas comerciales, sin un análisis previo. Como consecuencia, el control de las enfermedades usando estos protocolos no es siempre satisfactorio. Además la manipulación de los pesticidas no es siempre la adecuada y por ser la mora de castilla una fruta de producción permanente el tiempo que transcurre entre la fumigación y la cosecha no es el recomendado provocando la contaminación de quienes consumen la fruta.

El INIAP a través del Programa de Fruticultura con apoyo del departamento de Protección Vegetal ha venido desarrollando componentes tecnológicos para el manejo de la mora de castilla en cuanto a nutrición, manejo de plagas y enfermedades con enfoque a obtener frutos libres de residuos de pesticidas. Se hace necesario integrar estos componentes en estrategias de manejo de fácil adopción por parte del productor que no funcionen como recetas sino más bien como medidas de prevención y control de plagas y enfermedades en la mora en el momento oportuno optimizando recursos y disminuyendo la utilización de pesticidas sintéticos o sustituyéndolos por productos biológicos o de certificación orgánica si la situación lo amerita.

2.1.11.3. Metodología

FASE 1. Desarrollo epidemiológico de la enfermedad

Se realizó un seguimiento de los síntomas en las diferentes fases fenológicas de un ciclo productivo de mora de castilla, para establecer con claridad el progreso de la epidemia y definir las fases fenológicas más sensibles para realizar una mejor intervención de control y manejo agronómico. Se seleccionaron 5 plantas en una plantación, a la que se realizó una poda fuerte para obtener nuevos brotes, en los que se realizó el seguimiento de la fenología y la enfermedad sin la aplicación de fungicidas.

FASE 2. Evaluación *in vitro* de la eficiencia de fungicidas para el control de *Botritis sp*.

En laboratorio se evaluaron 30 fungicidas utilizados para el control de Botrytis, 11 protestantes, 17 sistémicos y 2 ecológicos; el ensayo se realizó en los laboratorios del Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP. Para evaluar los fungicidas, se tomaron muestras de plantas de mora afectadas con *Botrytis sp.* de tres sitios seleccionados, Chillanes, Tumbaco y Píllaro y se aislaron en medio PDA. Se trabajó con tres dosis para cada tipo de fungicida. Para el análisis de los resultados se usó la variable EC50 la cual fue calculada para cada fungicida y cada aislamiento. Utilizando la EC50 se realizó un cuadro comparativo que permitió obtener los seis mejores fungicidas para la evaluación en campo.

FASE 3. Evaluación de fungicidas y efecto de podas fitosanitarias para el control de *Botryitis cinerea*.

La evaluación de los fungicidas eficientes para el control de botrytis en campo se realizó en dos localidades, la una ubicada en la provincia Bolívar, cantón Chillanes, comunidad Jashi con una altitud de 2260 m.s.n.m, temperatura media anual de 15ºC y precipitación media de 750 a 1000 mm y la otra localidad localizada en la provincia Tungurahua, cantón Píllaro, parroquia San Miguelito con una temperatura media anal de 15ºC y la precipitación media de 680 mm. En campo se evaluaron dos factores, los fungicidas que resultaron mejores en el experimento de sensibilidad en interacción con dos tipos de poda; en virtud de la importancia de esta práctica para el manejo de la enfermedad. Los tipos de poda evaluados fueron: poda fuerte o INIAP, que se realizó una sola vez por ciclo productivo y consiste en cortar ramas primarias, secundarias, terciarias, en mal estado y las que ya han producido, cortando a dos yemas las ramas secundarias y terciarias de buen estado, también despuntando los chupones que son ramas infértiles y emiten ramas productivas; en lo posible tratando de dejar de 6 a 9 tallos principales por planta. La poda de mantenimiento o del Agricultor que se realizó mensualmente durante el estudio, que consiste en cortar todas las ramas con problemas fitosanitarios y ramas entrecruzadas, así como las que ya han producido.

Tabla 20. Fungicidas eficientes para el control In vitro de *B. cinerea* y estrategias de aplicación para las parcelas con poda alternativa (INIAP).

Tratamientos	Poda (semana 0)	Formación de Yema apical (semana 5-6)	Flor abierta (semana 7-8)	Inicio desarrollo fruto (semana 10)	Inicio madurez fruto (semana 12-13)
T1	Caldo bordelés	Sistémico	CB	Sistémico	biológico
T2	Caldo bordelés	Procloraz	Caldo bordelés	Procloraz	Bacillus spp
T3	Caldo bordelés	Cyproconazol	Caldo bordelés	Cyproconazol	Bacillus spp
T4	Caldo bordelés	Iprodione	Caldo bordelés	Iprodione	Bacillus spp
T5	Caldo bordeles	Himexazole	Caldo bordelés	Himexazole	Bacillus spp
T6	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp

En la tabla 20 se presentan los fungicidas que se aplicaron en las parcelas de poda fuerte (INIAP) y en la tabla 21 los fungicidas que se aplicaron en las parcelas de poda del agricultor y la estrategia de aplicación respectiva según el estado fenológico del cultivo.

Tabla 21. Fungicidas eficientes para el control invitro de *B. cinerea* y estrategias de aplicación para parcelas con poda del agricultor.

Tratamiento	Poda (0)	Semana 5-6	Semana 7-8	Semana 10	Semana 12-13
T7	Caldo bordelés	Sistémico	Caldo Bordelés	Sistémico	Biológico
T8	Caldo bordelés	Procloraz	Caldo bordelés	Procloraz	Bacillus spp
T9	Caldo bordelés	Cyproconazole	Caldo bordelés	Cyproconazol	Bacillus spp
T10	Caldo bordelés	Difenocnazol	Caldo bordelés	Iprodione	Bacillus spp
T11	Caldo bordeles	Iprodione	Caldo bordelés	Difenoconazol	Bacillus spp
T12	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp	Bacillus spp

Con la interacción de fungicidas y podas se formaron 10 tratamientos que fueron dispuestos en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. En este experimento se incluyó un testigo satélite T11 (Poda y manejo del agricultor) y T12 Poda fuerte para seguimiento de desarrollo epidemiológico de la enfermedad.

Se etiquetaron y se realizaron las aplicaciones correspondientes de los tratamientos. En lo referente a la frecuencia de poda alternativa, terminado el ciclo

de producción de verano se volvió a realizar otra poda de este nivel para empezar el ciclo de producción de invierno. La fertilización se realizó basada en las necesidades del cultivo aplicando un nivel de 360-60-300 kg/ha/ ciclo. Además de las podas se realizó la limpieza del huerto que consiste en recolectar permanente el material podado y malezas en el área de goteo. En la localidad de Chillanes se realizaron 3 evaluaciones, dos en temporada de verano y una en temporada de invierno, mientras que en la localidad de Píllaro se evaluó en 2 ocasiones, pero no se procesaron los datos de la primera evaluación en esta localidad, en vista que por condiciones adversas del clima (granizada) las plantas se afectaron y se declaró como parcela perdida.

Análisis Estadístico

La unidad experimental estuvo constituida por 3 plantas de mora de castilla en estado productivo, con competencia completa, sembrada a una distancia de 2 m entre plantas y 2,5 m entre hileras. De cada unidad experimental se evaluó la planta central. En ésta se seleccionaron tres ramas (secundarias y/o terciarias) donde se tomaron los datos. Los datos se registraron cada vez que se aplicó el fungicida.

- Análisis de Varianza (ADEVA) al 5%
- Prueba de Tukey al 5% para comparar los promedios de los tratamientos.
- Análisis de correlación y regresión lineal.

Variables

Las variables agronómicas fueron: longitud de rama, número de yemas por rama, número de flores abiertas, número de tallos, número de centros de producción, número de brotes vegetativos nuevos por planta, número de hojas, presión de pulpa, grados brix, rendimiento. Las variables fitopatológicas fueron: número de frutos sanos, número de frutos con *Botrytis sp*., lo que permitió obtener la incidencia de Botritis, empleando la siguiente formula: Incidencia = (Frutos enfermos/total de frutos por repetición) * 100, número de días útiles en postcosecha, incidencia de otras pudriciones, incidencia de Oidium sp.

RESULTADOS DE LA FASE 3

A continuación se presentan los resultados de las evaluaciones de las variables en campo que según el análisis de varianza resultaron estadísticamente significativas, permitiendo determinar los fungicidas más eficientes en campo para el manejo de Botrytis en mora de castilla.

LOCALIDAD CHILLANES

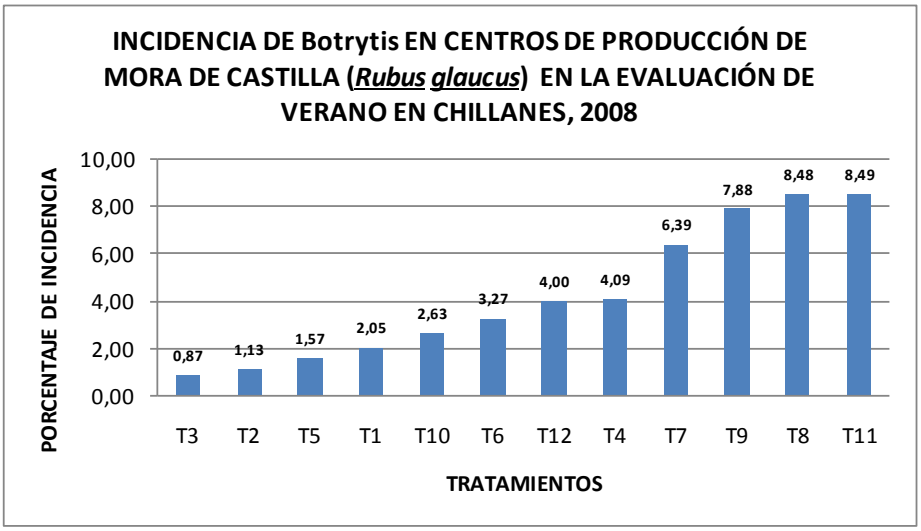
Como resultado del análisis de correlación y regresión lineal de las variables independientes que tuvieron una relación o asociación significativa con el rendimiento de mora de castilla (Kg/Planta) durante la primera evaluación de

verano en la localidad de Jashi, Chillanes 2008, se calcularon correlaciones altamente significativas para número de centros de producción sanos versus el rendimiento (Kg/planta), de mora de castilla con 0,514, siendo este el valor más alto; de igual manera la variable independiente que incrementó el rendimiento en forma significativa fue el número de centros de producción sanos, es decir valores más elevados de esta variable significó un mayor rendimiento de mora de castilla, así mismo, el número de centros de producción enfermos disminuyeron el rendimiento; con estas consideraciones se analizó la varianza, tukey al 5% e incidencia de la enfermedad de esta variable.

Con la prueba Tukey al 5% para tratamientos se determinó que el mayor número de centros de producción sanos se encontró en T6 (Poda de mantenimiento + Procloraz) con un promedio de 112,6 centros de producción seguida de T1 (Poda fuerte + Procloraz) con 106,2 centros, mientras que el menor número de centros de producción se registró en T7 (Poda de mantenimiento + Cyproconazol) con 47,66 centros de producción sanos.

La incidencia de botrytis en centros de producción de plantas de mora de castilla en la primera evaluación de verano en Chillanes (Gráfico 4), fue ligera, las plantas que presentaron mayor porcentaje de incidencia de botrytis en centros de producción fueron las de T11 (Testigo satélite) con poda y manejo del productor con el 8,49% de incidencia, seguida estrechamente por T8 (Poda de mantenimiento + Difenoconazol) con el 8,48% de incidencia; el tratamiento en el que se registró menor porcentaje de incidencia de Botrytis fue T3 (Poda fuerte + Aprisione) con el 0,87%.

Gráfico 4. Incidencia de Botrytis en centros de producción de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en la evaluación de verano en Chillanes, 2008.



En cuanto al rendimiento, no hay diferencias estadísticas entre el factor A, podas, pero matemáticamente se obtuvo mayores rendimientos con la poda de mantenimiento (4,93 Kg/planta), esto se debe a que el tamaño de las plantas fue

mayor en este bloque. En lo referente al factor B, fungicidas no hay diferencias estadísticas para rendimientos pero matemáticamente se obtuvo mayores rendimientos en los tratamientos que se aplicó Bacillus spp. En la interacción de los factores podas por fungicidas no se encontró diferencias estadísticamente, pero matemáticamente se obtuvo mayores rendimientos en las plantas donde se aplicó la poda fuerte más el fungicida Bacillus spp (T5), seguida de las plantas donde se aplicó la poda de mantenimiento más el fungicida procloraz (T6).

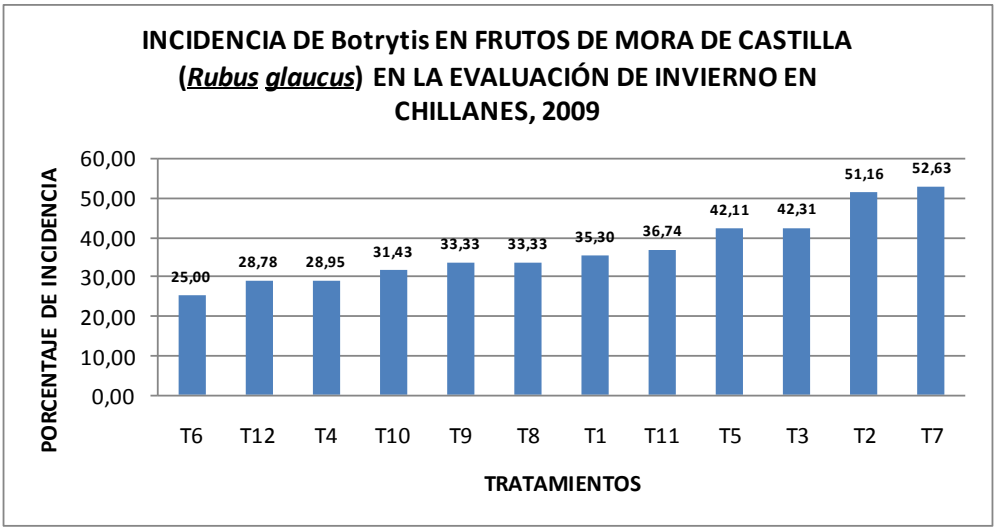
Incidencia de Botrytis en mora de castilla en época de invierno en Chillanes

En análisis de la variable número de centros de producción con la prueba Tukey al 5% para tratamientos determinó que el mayor número de centros de producción sanos (90,67) corresponde a T1 (Poda fuerte + procloraz), y el menor número de centros de producción de mora de castilla sanos en época de invierno en promedio es de 9,3 correspondiente a T2 (Poda fuerte + Cyproconazol). Mientras que el mayor número de centros de producción enfermos es de 56,67 en promedio, que corresponde a T9 (Poda de mantenimiento + Bacillus spp.), y el menor número de centros de producción enfermos corresponde a T11 (Testigo satélite) con 22 centros en promedio seguido de T10 (Poda de mantenimiento + Aprisione) con 26,33 centros en promedio.

Según la prueba de Tukey al 5%, se determinó que el mayor número de frutos sanos corresponde a plantas de T12 con 15,67 en promedio, seguida de T5 (Poda fuerte + Bacillus spp.) con 11 frutos sanos en promedio, y el tratamiento que presenta el menor número de frutos sanos es T7 (Poda de mantenimiento + Cyproconazol) con un promedio de 3 frutos. Y el mayor número de frutos enfermos en invierno es de 8 que corresponde a T5 (Poda fuerte + Bacillus spp.), seguida de T2 (Poda fuerte + Cyproconazol) con 7,3 frutos enfermos en promedio por rama; y, el menor número de frutos enfermos se encontró en T6 (Poda de mantenimiento + Procloraz) con 1,3 frutos enfermos.

Los frutos de mora de castilla durante la evaluación de invierno presentaron una incidencia de botrytis desde regular a mediano, siendo la de menor incidencia T6 (Poda de mantenimiento + Procloraz) con 25% , según la escala corresponde a una calificación de regular; el mayor porcentaje de incidencia se registró en T7 (Poda de mantenimiento + Cyproconazol) con el 52,63%, seguida de T2 (Poda fuerte + Cyproconazol) con 51,16% que corresponden a una calificación de mediana incidencia de la enfermedad (Gráfico 5).

Gráfico 5. Incidencia de Botrytis en frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en la evaluación de invierno en Chillanes, 2009.



En lo referente a rendimiento, no se determinó diferencias estadísticas entre el factor podas, pero matemáticamente se obtuvo mayores rendimientos (1,99 Kg/planta) con la poda de mantenimiento. Respecto al factor fungicidas no se determinaron diferencias estadísticas para la variable rendimiento, pero matemáticamente se obtuvo mayores rendimientos con el fungicida Difenoconazol con 4,29 Kg/planta seguida de Bacillus spp con 2,21 Kg/planta.

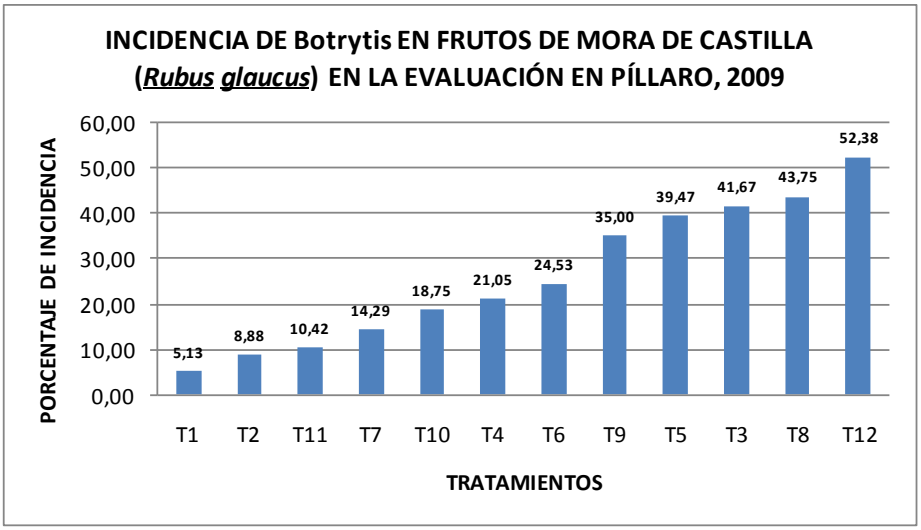
LOCALIDAD PILLARO

Incidencia de Botrytis en frutos de mora de castilla en Pillaro, provincia Tungurahua.

Con la prueba de Tukey al 5% para tratamientos en la evaluación de fungicidas eficientes para el control de Botrytis en mora de castilla en Píllaro, se determinó que el mayor número de frutos sanos corresponde a plantas de T10 (Poda de mantenimiento + Iprodione) con 17,33 en promedio, y el tratamiento que presenta el menor número de frutos sanos es 6,67 que corresponde a T12, seguida de T3 (Poda fuerte + Iprodione) con un promedio de 7 frutos. Y el mayor número de frutos enfermos en Píllaro es de 7,33 que corresponde a T12, seguida de T8 (Poda de mantenimiento + Difenoconazol), con 7 frutos enfermos en promedio por rama; y, el menor número de frutos enfermos se encontró en T1 (Poda fuerte + Procloraz) con 0,67 frutos enfermos.

Los frutos de las ramas muestra evaluados presentaron una incidencia de botrytis de ligera a mediana, el menor porcentaje se registró en T1 (Poda fuerte + Procloraz) con 5,13%, la mayor incidencia de la enfermedad se registró en plantas del seguimiento epidemiológico con 52,38%, le sigue plantas de T8 (Poda de mantenimiento + Difenoconazol) con 43,75%. (Gráfico 6)

Gráfico 6. Incidencia de Botrytis en frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en la evaluación en Píllaro 2009.



Con respecto al rendimiento**,** en lo referente al factor Podas según el análisis de varianza no se determinó diferencias estadísticamente significativas, sin embargo matemáticamente se obtuvo mejores rendimientos con la poda de mantenimiento con 3,20 Kg/planta. Para fungicidas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero matemáticamente se registró mayores rendimientos en plantas donde se aplicó el fungicida Cyproconazol con 3,5 Kg/planta. Con la prueba Tukey al 5% para los tratamientos en estudio se determinó que el mayor rendimiento es 5,64 Kg/planta que corresponde T5 (Poda fuerte + Bacillus spp.) y el rendimiento más bajo es de 0,9 Kg/planta que corresponde a T9 (Poda de mantenimiento + Bacillus spp.)

2.1.11.4. Conclusiones

Según los análisis de varianza, tukey, regresión y correlación realizados en el presente estudio se llega a las siguientes conclusiones:

- En la primera evaluación de verano en la localidad de Jashi, Chillanes el fungicida más eficiente para el control de Botrytis en campo fue Procloraz, tomando en cuenta la variable centros de producción sanos, que más contribuyó al incremento del rendimiento, en tratamientos que se aplicó este fungicida se obtuvo mayor número de centros de producción sanos (109).
- En la primera evaluación de verano en Jashi, Chillanes se obtuvo mayores rendimientos con la poda de mantenimiento (4,93 Kg/planta)
- La poda con la que se obtuvo mayores rendimientos durante la evaluación de invierno en Jashi fue la poda de mantenimiento (1,99 Kg/planta).
- El fungicida más eficiente para el manejo de botrytis en campo durante la época de invierno es Difenoconazol obteniéndose mayores rendimientos con este fungicida (2,52 Kg/ha).

- En la segunda evaluación de verano se obtuvo mayores rendimientos con la poda de mantenimiento (9,1 Kg/planta) y con el fungicida difenoconazol (12,52 Kg/planta).
- En Jashi durante la evaluación en verano se obtuvo un rendimiento promedio de 7,25 Kg/planta, mientras que en invierno el rendimiento fue de 1,77 Kg/planta, registrando un 75,6% menos de rendimiento en época lluviosa.
- En la evaluación en la localidad de San Miguelito, Píllaro la poda que registra mayores rendimientos es la poda de mantenimiento con 3,20 Kg/planta, el fungicida más eficiente para el control de Botrytis en campo fue Procloraz, en vista que los tratamientos en los cuales se aplicó este fungicida registra mayor número de yemas, flores, frutos y centros de producción sanos, puesto que estas variables incrementan significativamente el rendimiento según el coeficiente de regresión.
- En Píllaro el fungicida con el que se obtiene mayores rendimientos es Cyproconazol, pero no se considera efectivo para el manejo de botrytis en campo puesto que en los análisis estadísticos no presenta resultados importantes en cuanto a la sanidad de yemas, flores, centros de producción y frutos, además altera el crecimiento vegetativo de las ramas, hojas y frutos.
- El segundo fungicida en orden de importancia efectivo en campo en Pillaro fue Iprodione presentando rendimientos de 3,29 Kg/planta y registró mayor número de yemas y flores sanas.

2.1.11.5. Recomendaciones

- Considerando las condiciones climáticas en la localidad del cantón Chillanes se recomienda realizar podas de mantenimiento en época de verano y una poda fuerte en época de invierno.
- Con base a los resultados de la evaluación de los fungicidas en campo se recomienda diseñar estrategias de manejo para época de invierno y para época de verano para la localidad de Chillanes.
- En época de verano en la localidad de Chillanes se recomienda incluir los fungicidas Iprodione y Procloraz en la estrategia de control de botrytis.
- En época de invierno en la localidad de Chillanes se recomienda incluir los fungicidas Difenoconazol y Procloraz en la estrategia de control de botrytis.
- Para la zona de Pillaro se recomienda incluir en los controles de Botrytis los fungicidas Procloraz e Iprodione.
- Realizar aislamientos de Botrytis en las localidades en estudio para determinar su especie.

FASE 4. Validación de un programa de manejo integrado de *Botrytis cinérea* en Mora de Castilla (*Rubus glaucus B.)* en Bolívar y Tungurahua.

La fase de validación del programa de manejo integrado de Botrytis en mora de castilla se realizó en la Provincia Bolívar, Cantón Chillanes, Recinto Perezan.

Los tratamientos de la presente investigación constituyen dos Estrategias de Manejo para Botrytis en mora de castilla. La Estrategia de Manejo Convencional para *B. cinerea* en mora de castilla que consiste en la utilización de los mejores fungicidas eficientes para el control de *B. cinerea*, evaluados en la fase 3, combinando con del manejo agronómico del cultivo favorable para la producción limpia de mora de castilla; y la Estrategia de Manejo Orgánico para *B cinerea* en mora de castilla que consiste en la utilización de fungicidas orgánicos, además del manejo agronómico del cultivo complementando con productos orgánicos tanto al follaje como al suelo. Se evaluó como testigo el manejo que realiza el productor de mora de castilla.

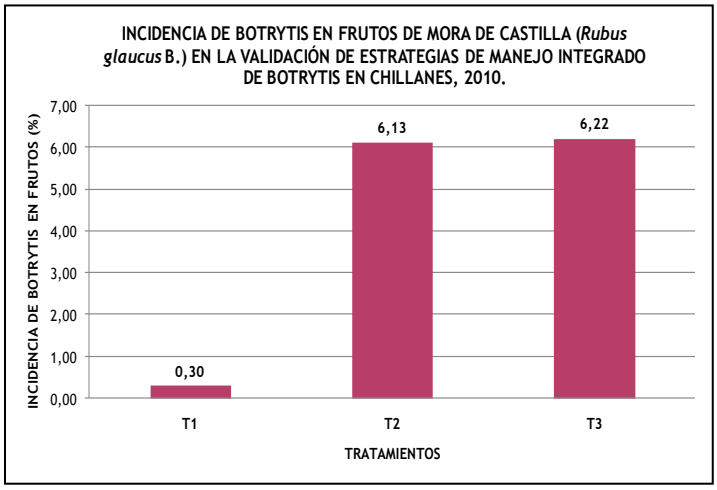
La unidad experimental estuvo constituida por 20 plantas de mora de castilla en estado productivo, con competencia completa, sembrada a una distancia de 2 m entre plantas y 2,5 m entre hileras. De cada unidad experimental se evaluó 3 plantas centrales. En esta se seleccionaron dos ramas (secundarias y/o terciarias) donde se tomaron los datos, mismos que se registraron cada 15 días. Además de las podas se realizó la limpieza del huerto que consiste en recolectar permanente el material podado y malezas en el área de goteo. El manejo se complementó con la aplicación de caldo bordeles, trichoderma o insecticidas al suelo según la necesidad, en caso de presencia de Verticillium en las plantas de mora dentro del estudio.

RESULTADOS FASE 4

Incidencia de Botrytis en frutos de mora de castilla

Los frutos durante la evaluación de estrategias de manejo de botrytis en mora de castilla presentaron una incidencia ligera de la enfermedad, T1 Estrategias de manejo limpio presentó un 0,3% de incidencia, T2 Estrategias de manejo orgánico presentó 6,13% de incidencia y el testigo 6,22%.

Gráfico 7.

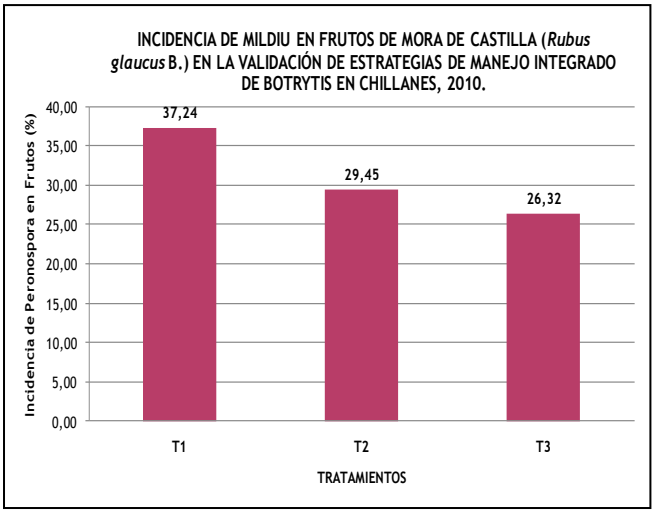


Incidencia de otras enfermedades

En época lluviosa los diferentes estados fenológicos de la mora de castilla fueron atacados por Mildeo velloso provocado por *Peronospora sp.* Se encontraron síntomas de mildeo en yemas, flores y frutos de mora de castilla disminuyendo el rendimiento y la calidad de la fruta.

Los frutos de mora durante la evaluación de estrategias de manejo de botrytis presentaron una incidencia regular de mildeo, evidenciándose un mayor porcentaje en T1, manejo limpio con 37,24%; T2 manejo orgánico presentó un 29,45 % de incidencia de mildeo y en el testigo se encontró un 26, 32% de incidencia de mildeo en frutos de mora de castilla.

Gráfico 8.



Conclusiones

- La estrategia de manejo que se implemente en el huerto de mora depende de las condiciones en que se encuentre, tomando en cuenta la zona de cultivo y la época, donde influye temperatura, humedad y precipitación.
- Con la estrategia de manejo limpio se obtuvo menor incidencia de frutos con botrytis en el área de estudio.
- En la zona de Chillanes con el manejo adecuado del cultivo se puede prolongar el tiempo de producción de la fruta hasta el mes de febrero.
- En condiciones de humedad si no se toma las medidas de control oportunas y adecuadas; yemas, flores y frutos en desarrollo son atacados por peronospora sp, cuyos síntomas en yemas y flores son la necrosis y en frutos la deformidad, mientras que síntomas y signos de botrytis se evidencian en frutos que inician maduración y en postcosecha.
- La nutrición, poda y limpieza del huerto son factores importantes para disminuir la incidencia de botrytis y mildeo en la mora de castilla.

Recomendaciones

- En la zona de Chillanes se recomienda realizar una poda fuerte en época de invierno para iniciar el ciclo de producción uniforme lo que permita mantener mayor control en el manejo de enfermedades. Luego realizar podas de mantenimiento de forma permanente para evitar los focos de infección.
- En vista que el ataque de mildeo se produce en el estado de yema se recomienda en esta época aplicar el fungicida adecuado, como fosfanato de potasio o si el ataque es severo fungicida sistémico a base de cymoxanil y propamocarb.
- El control para botrytis inicia cuando la mayoría de ramas productivas presentan frutos en desarrollo, en este caso se puede aplicar procloraz, iprodione o difenoconazol, después de tres semanas rotar con caldo bordelés o fungicidas biológicos como Bacillus spp. o Trichoderma spp. Se puede repetir la aplicación del fungicida sistémico cuidando de no exceder de dos aplicaciones por ciclo productivo para evitar que el patógeno adquiera resistencia.
- Es indispensable dar una adecuada nutrición edáfica a la planta en función de los requerimientos del cultivo de 360-60-300 en forma fraccionada y vía foliar con los micro elementos quelatados de Boro, Hierro, Zinc y Calcio según los estados fenológicos.
- Es recomendable impedir que el inoculo de Botrytis permanezca en el huerto manteniendo la sanidad, para lo que se debe eliminar las malas hierbas y los restos de la poda.

2.2. RESULTADOS EN LULO

2.2.1. Caracterización molecular con marcadores RAMS de accesiones de lulo provenientes de ecuador[15]

Objetivo del proyecto (2): *"Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.1.1. Marco referencial

Entre los marcadores moleculares conocidos, los RAMs (Random Amplified Microsatellite o Microsatélites Amplificados al Azar) muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no lo hace (Henríquez, 2000), por lo tanto son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales. La diversidad genética mantiene un reservorio de condiciones de variación de respuesta al

[15] Ovalle Tatiana, Alvarez Elizabeth, Mejía Juan Fernando, González Alonso. Programa Frutas Tropicales, Centro Internacional de Agricultura Tropical.

medio ambiente, que permite la adaptación y la supervivencia. Ante ello, la importancia de conocer y caracterizar a los individuos de una especie. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar molecularmente accesiones de Lulo (*Solanum quitoense*) provenientes de Ecuador, utilizando la técnica basada en microsatélites denominada RAMs.

2.2.1.2. Metodología

Cuantificación ADN

Se utilizó el ADN de 51 accesiones de Lulo provenientes de Ecuador. El ADN se re suspendió en TE 1mM y se visualizó en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con Sybr Safe, para constatar su calidad. La cuantificación se realizó en Nano drop 2000c, todas las muestras se llevaron a una dilución de 5 ng/µl. Para evaluar la diversidad genética se utilizaron ocho cebadores tipo RAMs sintetizados por Technologies Inc reportados como polimórficos para este tipo de estudios en *Rubus* spp, (Morillo *et al*, 2005), *Psidium guajava* (Sanabria *et al*, 2006), *Physalis* (Bonilla & Espinosa, 2003) **(Tabla 22)**.

Tabla 22. Cebadores utilizados en la técnica RAMs

Primer	Secuencia (5' a 3')
CCA	$DDB(CCA)_5$
CGA	$DHB(CGA)_5$
GT	$VHV(GT)_5G$
AG	$HBH(AG)_7A$
CT	$DYD(CT)_7C$
TG	$HVH(TG)_7T$
CA	$DBDA(CA)_7$

Las siguientes designaciones se usaron para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

Amplificación ADN

Para la reacción de amplificación con microsatélites RAMs se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrífuga (1.5 ml) para un volumen final de 12.5 µl. La mezcla de reacción se preparó con Go Taq Green Master Mix 2X la cual contiene buffer, $MgCl_2$ 3mM, DNTPs 400µM c/u , Taq Polimerasa 1 U/ µl, cebador 10 µM y ADN genómico 5 ng/µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PTC-100 Programmable Termal Controller de M. J Research Inc). Los programas para la amplificación variaron dependiendo del cebador. En cada grupo de muestras para amplificación se incluyó un control negativo para detectar posible contaminación (Hantula et al., 1997). El producto amplificado se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.8% a 80 voltios durante 3 a 6 horas dependiendo del cebador, visualizándose con luz ultravioleta en un transiluminador, y posteriormente se fotografió.

Análisis Estadístico

Se generó una matriz binaria que representó la ausencia de banda como cero (0) y la presencia como uno (1). Se calculó el índice de similaridad de DICE y se realizó el análisis de clúster por el método UPGMA el cual generó un dendograma utilizando el paquete estadístico NTSYS –pc versión 2.1. La representación multidimensional de los individuos se realizó con un análisis de correspondencia múltiple generado mediante el programa estadístico SAS.

2.2.1.3. Resultados y Discusión

La visualización del ADN de las 51 accesiones mostró 44 ADNs con concentraciones mayores a 10 ng/µl. (figura 76)

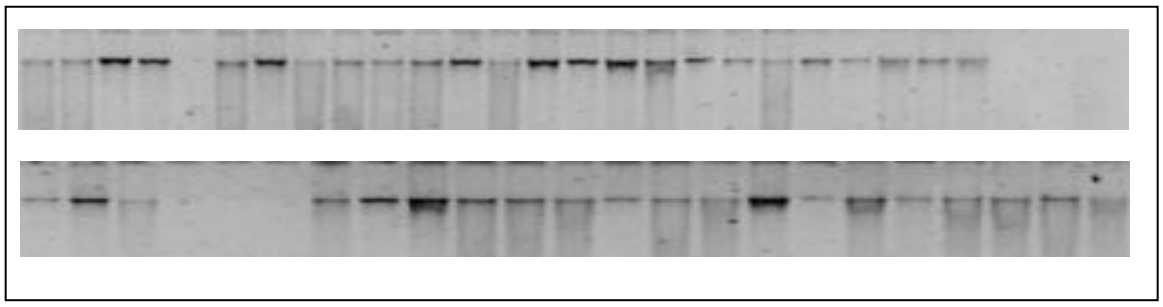


Figura 76**.** ADNs de lulo provenientes de Ecuador

Un total de 49 individuos fueron caracterizados con los ocho primers. Se generó una matriz binaria con 9408 entradas, de las cuales 1919 fueron bandas presentes y 7489 ausentes. El número de bandas por cebador varió de 15 para CCA hasta 33 para CGA (Tabla 23). Las bandas amplificadas tuvieron pesos moleculares ente 300 y 1600 pb (Figura 77).

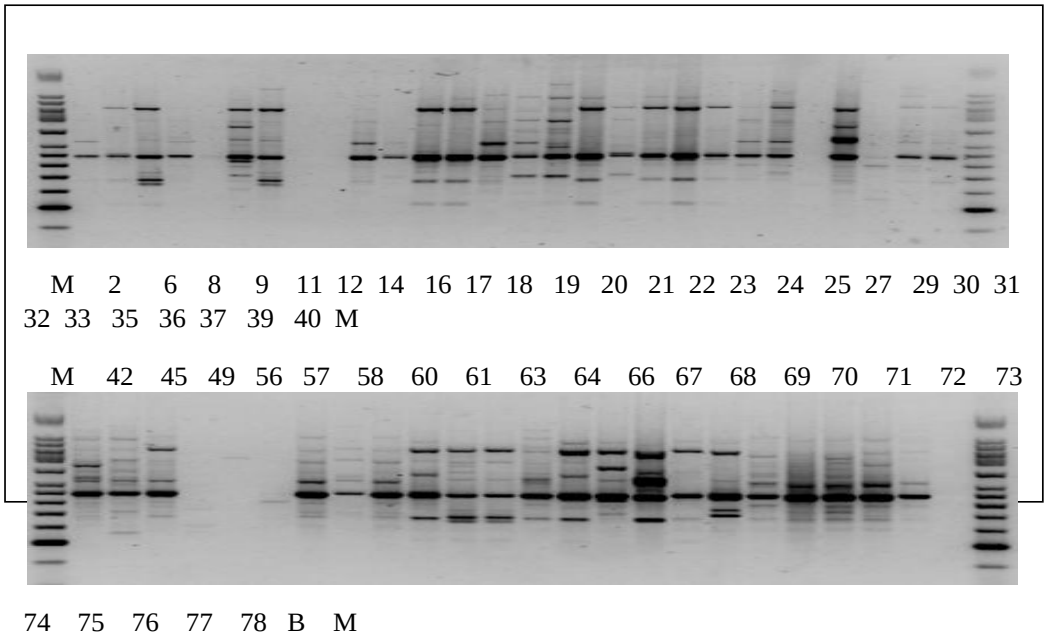


Figura 77. Patrones de bandas en Lulo generados por el cebador RAMs CCA. M: marcador de peso Hyper Ladder II, B: Control Negativo.

Tabla 23. Bandas totales con cada uno de los cebadores.

Cebador	N° de bandas Totales	N° bandas con freq. >=10%	% de bandas Frecuentes	% de bandas Escasas
CA	24	17	71	30
CCA	15	12	80	20
ACA	24	24	100	0
CT	15	14	93	7
TG	19	15	79	21
GT	31	27	87	13
CGA	33	26	79	21
AG	31	26	84	16

El análisis de la matriz binaria dio como mostró dos cebadores con características importantes en la caracterización de materiales de lulo; el primero de ellos es el CA que presentó un total de 24 bandas donde el 30 % de estas son bandas escasas, que permiten encontrar regiones genéticas poco comunes y así diferenciar dos genotipos. El segundo cebador es el ACA con 24 bandas y un 100% de bandas frecuentes, el cual es útil para determinar qué tan similar es una población.

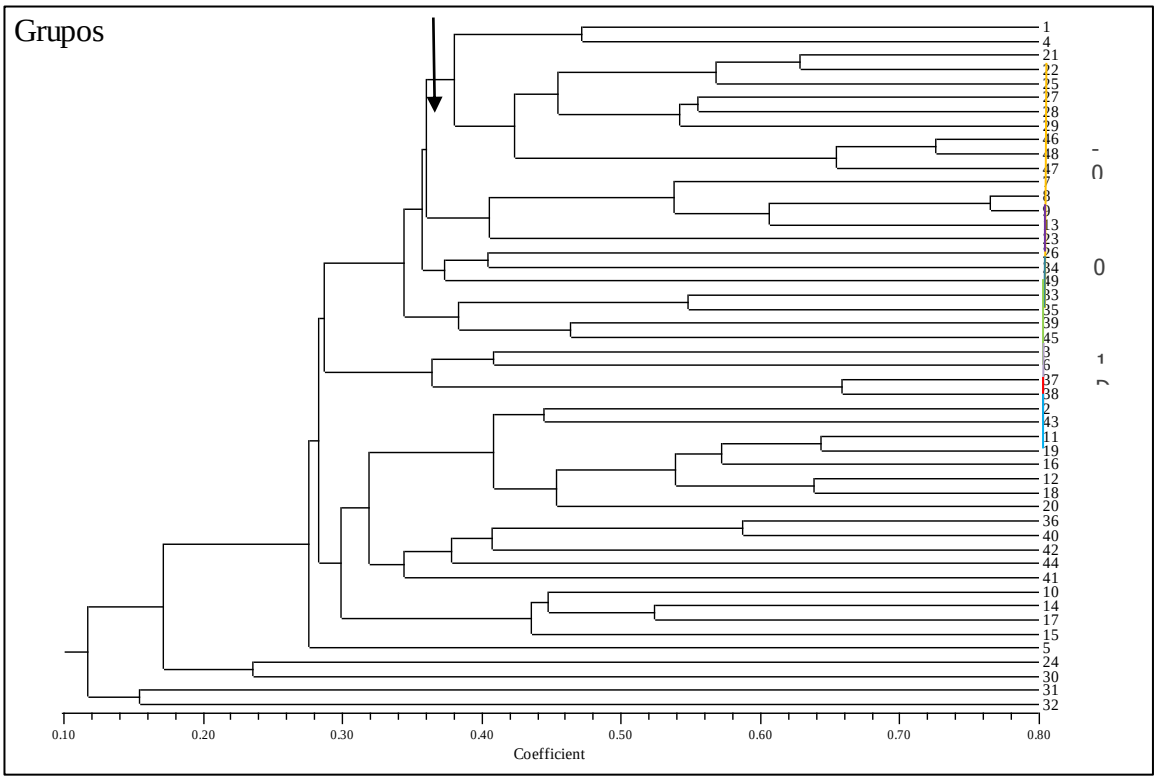


Figura 78. Dendograma de la estructura genética de 49 accesiones de Lulo basado en el Coeficiente de Similitud de DICE, calculado a partir de los datos combinados de ocho primers Microsatélites RAMs.

El análisis mediante el coeficiente DICE, a un nivel de similitud de 0.34 estableció 6 grupos bien definidos (A,B,C,D,E y F) y un último grupo (G*), muestra 4 individuos no relacionados (fig. 78). El dendograma de la estructura genética establece una alta variabilidad en las accesiones de lulo presentes en el estudio y sugiere 49 haplotipos (individuos con estructura génetica idéntica que presentan por lo menos una banda de diferencia frente a otro individuo, al utilizar técnicas moleculares). El análisis de correspondencia múltiple con RSQ del 83.2% separó las accesiones de Lulo en siete grupos (tabla 24) y permitió obtener la representación multidimensional de los individuos. (Figura 79 y 80).

Tabla 24. Accesiones de Lulo pertenecientes a cada uno de los grupos.

Grupo	Accesiones
1	46,48,25,33,39,49,4,27,29,28,47,22,26,34,21
2	10,15,14,41,44,5,40,17
3	2,20,43,16,18,11,19
4	37,38,3
5	36,9,1
6	6
7	13

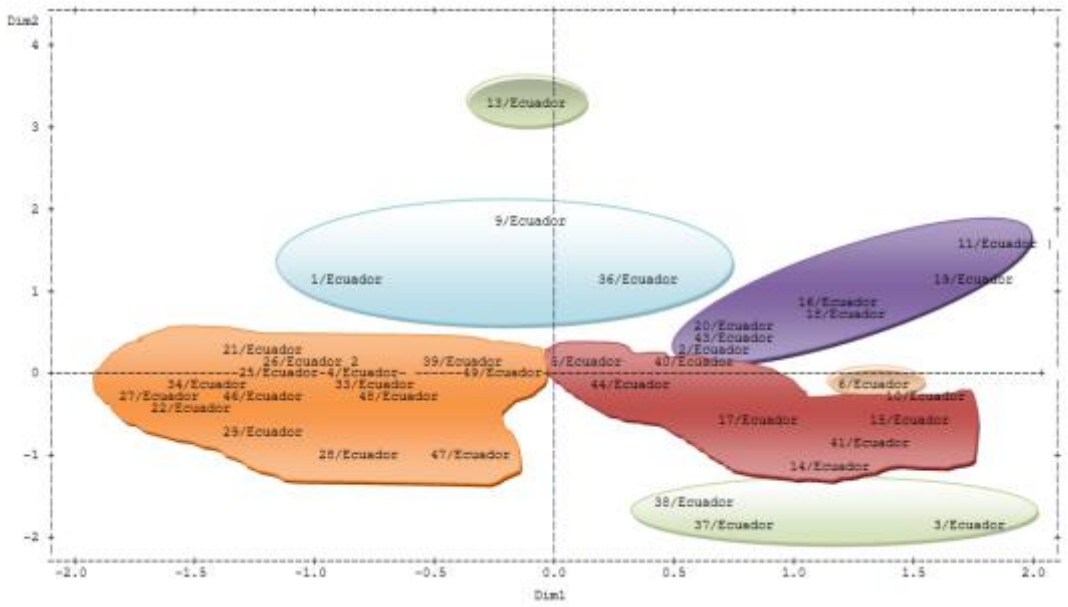


Figura 79. Representación bidimensional de las accesiones de Lulo generado a partir del ACM.

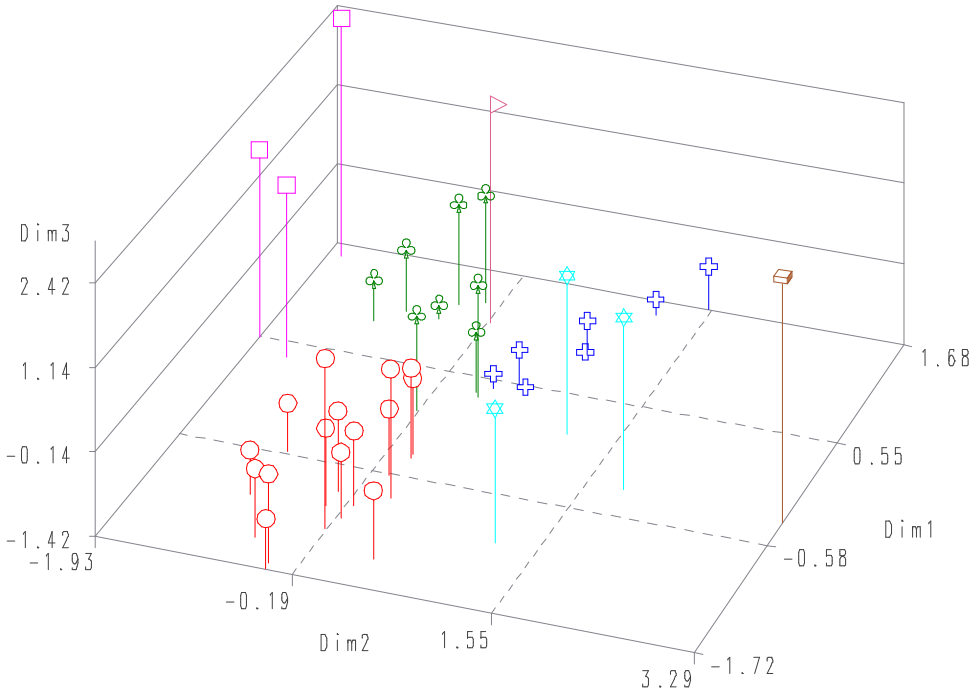


Figura 80. Representación tridimensional de las accesiones de Lulo generado a partir del ACM.

Para interpretar estos resultados se sugiere agregar datos morfo agronómicos y de distribución geográfica, que permita establecer alguna relación funcional entre los grupos formados que se muestran en el dendograma y en el Análisis de correspondencia Múltiple. De esta manera los grupos genéticos obtenidos pueden ser ajustados, como en el caso de los grupos 6 y 7 y su relación con el 2 y 5 respectivamente (Fig. 79).

2.2.1.4. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el estudio se concluye que el análisis intraespecífico con marcadores RAMs (Microsatélites Amplificados al Azar) permitió detectar la variabilidad genética entre las accesiones de lulo (*Solanum quitoense X S ?*). Se determinó que los cebadores ACA y CA producen un alto poliformismo y resultaron útiles en el establecimiento de las relaciones entre las accesiones. Por lo tanto, los RAMS es una herramienta útil a la hora de evaluar la diversidad genética en poblaciones naturales.

2.2.1.5. Bibliografía

Bonilla B., M.l; Espinosa P, K. 2003 Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva *Physalis peruviana* L. Trabajo de grado Ing Agr. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Hantula, J.; Dusabenyagasani, M.; Hamelin, R. C. 1997. Random Amplifield Microsatellites (RAMS) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur. J. For. Path. 26 : 159 – 166.

Henríquez N. M A. 2000. Diversidad genética de Phaeoisariopsis griseola (Sacc) Ferraris, utilizando marcadores moleculares. Trabajo de grado Ing Agr. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. 101 p.

Morillo, A. *et al.* Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp., de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Acta Agronómica, Colombia. Vol. 54, No. 2 (2005); p. 15-24

Sanabria, h. *et al*. Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el valle del Cauca. Acta Agronómica. Vol. 55, No 1(ene-mar.2006)

2.2.2. Caracterización agro-morfológicamente de clones y segregantes de 39 cruzamientos interespecíficos de naranjilla para identificar materiales promisorios con características de resistencia y/o tolerancia a plagas y enfermedades, alta productividad y buena calidad del fruto. san francisco - la célica - pichincha, 2008[16][17]

Objetivo del proyecto (2): *"Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*.

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élites seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados".*

---

[17] *Paúl Gómez, Pablo Viteri, Juan León, Wilson Vásquez* Resumen de Tesis de Grado previo a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario.

2.2.2.1. Objetivos

Objetivo General

- Identificar materiales de los cruzamientos interespecíficos con características de resistencia y tolerancia a (*Fusarium oxysporum*) y Nemátodos (*Meloidogyne incognita*), productividad y buena calidad del fruto.

Objetivos Específicos

- Describir agro-morfológicamente 147 clones y segregantes de 39 cruzamientos interespecíficos de naranjilla en el noroccidente de Pichincha, sector de San Francisco.
- Realizar el análisis de los frutos en los clones y segregantes de los 39 cruzamientos interespecíficos de naranjilla para determinar la calidad de la fruta.
- Seleccionar materiales promisorios con base a resistencia y/o tolerancia a (*Fusarium oxysporum*), Nemátodos (*Meloidogyne incognita*), Antracnosis del fruto (*Colletotrichum gloeosporioides*), lancha negra (*Phytophthora infestans*), Barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*) y Barrenador del Tallo (*Faustinus apicalis*) principalmente, con alta productividad y calidad del fruto.

2.2.2.2. Marco Referencial

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en la actualidad constituye un cultivo de consumo popular y de gran importancia económica, transformándose en la segunda especie más cultivada después del banano en el Ecuador, a pesar de que no ha alcanzado su potencial desarrollo tecnológico (INEC, 1992).

Naranjilla, “Lulo” o “lulum” para los incas, es una planta originaria de los bosques húmedos de los Andes de América del Sur específicamente Colombia, Ecuador y Perú de regiones frescas y sombreadas (CORPOICA, 2002). Este cultivo tiene gran potencial económico por sus rentabilidades altas y aceptación en el mercado. Según Fiallos (2000), si el cultivo tuviera un manejo adecuado y tecnificado podría llegar a generar una rentabilidad alta (164 %), mientras que Revelo (2003) estima una rentabilidad de 124%. Para Castañeda (1995), el producto tiene una excelente aceptación en los mercados extranjeros, ya que los consumidores extranjeros prefieren diversificar su consumo de frutas tradicionales a exóticas (naranjilla, babaco, piña, etc.); además, según Villachica (1996), existe gran aceptación de los turistas que prueban la naranjilla, brindando oportunidades para la exportación de jugos, concentrados, congelados, etc. Por último, el gran número de emigrantes de los países productores de naranjilla, representan una estupenda demanda internacional, la cual facilitaría la introducción del producto en el mercado extranjero.

Una de las causas para la disminución de la producción, según Revelo (2003), es la susceptibilidad del cultivo a plagas y enfermedades, tales como gusano del fruto

(*Neoleucinodes elegantalis*), barrenador de la raíz (*Faustinus apicalis*) y del tallo (*Alcidion sp.*), lancha (*Phytophthora sp.*), marchitez vascular (*Fusarium sp.*), nemátodos (*Meloidogyne sp.*), los cuales aún no han sido controlados.

Otra problemática del cultivo, según Soria (1996), es el uso indiscriminado de pesticidas, la falta de tecnología en control de malezas y en el manejo del cultivo, incrementado los costos y bajando la rentabilidad. Toda esta problemática, obliga al agricultor a utilizar terrenos de montaña virgen, para así disminuir la problemática de plagas y enfermedades e incrementar la producción, generando un problema de deforestación y de rápida erosión del suelo, lo cual no es sustentable para las zonas en las que se desarrolla la naranjilla (Revelo, 2003).
El desarrollo de híbridos interespecíficos como Puyo y Palora (*S. sessiliflorum x S. quitoense*) han permitido la continuidad del cultivo (Heiser, 1993), aunque se ha desmejorado la calidad de la fruta. Actualmente el híbrido Puyo es cultivado en el 60% de la superficie de naranjilla en la Amazonía y es el de mayor distribución y consumo (ECORAE, 2001; Fiallos, 2000), lamentablemente para mejorar el tamaño de los frutos se realizan aplicaciones de 2-4D, producto hormonal perjudicial para la salud debido a la producción de toxinas cancerígenas (Revelo, y Sandoval, 2003; Soria, 1996; Lucio, y Espín, 1997). Trabajos recientes realizados por Ochoa y Gallardo (2005) y observaciones de campo en huertos de Saloya (INIAP, 2006), demuestran además la pérdida de resistencia de este híbrido a *Fusarium oxysporum*.

2.2.2.3. Metodología

La fase de campo se realizó en la localidad de San Francisco, Parroquia La Célica del Cantón Pedro Vicente Maldonado de la Provincia de Pichincha. Sitio que de acuerdo a la ubicación satelital, está ubicado a una altitud de 815 m.s.n.m a una latitud 0º 9´ 29” N y una Longitud de 78º 97´ 14” W. Tiene una precipitación promedio anual de 2 500 mm, una temperatura promedio anual de 21, 5 °C, una humedad relativa de 90 % ubicado en un zona ecológica Bosque Húmedo Montano Bajo (bhMB), (Cañadas, 1992). Una característica importante del suelo es que predomina la textura franca con un contenido de materia orgánica del 6.3% y con un pH ácido de 5.3 (Según análisis de suelo realizado el 29/08/2007- INIAP). Se evaluaron segregantes de 39 cruzamientos.

En la caracterización Agro-morfológica se empleó el Análisis Multivariado pues con la información que se generó de la caracterización y evaluación de las colecciones, se implementó métodos de investigación cuantitativa mediante estadísticas útiles bajo el sistema de Análisis Estadístico con el software ***Statistical Packet for Social Science, (SPSS)***, el cual ayuda a medir la variabilidad genética o conocer que tan variables son las accesiones a través de la similitud o diferenciación de los rasgos que caracterizaron a cada una de ellas. (IICA, 2006). Estas técnicas estadísticas multivariadas son herramientas muy útiles debido a que nos ayuda a caracterizar las accesiones, debido a que permiten describir o agrupar el conjunto de cruzamientos, tomando en cuenta simultáneamente varias características, sin dejar de considerar la relación que

existirá entre todos los caracteres en estudio. Para esto se hizo un análisis estadístico descriptivo, en el cual se involucran medidas de tendencia central como media aritmética, desviación típica y coeficiente de variación.

Además se requirió:

- Matriz de Similitud (Distancia de Gower). (GOWER, 1967).
- Análisis de agrupamiento (Método de Ward). (WARD, J. 1963).
- Determinación de variables discriminantes entre grupos (ENGELS, J. 1983).

Las variables evaluadas fueron: Inicio de la floración_(Días); Primer cuajado de frutos (Días); Madurez fisiológica del fruto_(Días); Altura de la planta (metros); Diámetro del tallo_(centímetros); Presencia de espinas en el tallo_(Si/No); Tamaño de las espinas en el tallo_(milímetros); Número de espinas en el tallo_(número); Tamaño de la hoja (centímetros);_Presencia de espinas en la hoja_(Si/No); Color de la hoja; Presencia de flores con pistilo corto y flores con pistilo largo (Si/No); Número de inflorescencias/rama/planta (número); Número de flores por inflorescencia (número); Número de frutos cuajados por inflorescencia (numero); Fructificación (%); Número de frutos caídos por inflorescencia (número); Forma del fruto; Peso de frutos cosechados (g); Rendimiento promedio por planta (kg/plt.); Tamaño del fruto (mm); categoría del fruto; Color de la pulpa; Porcentaje de sólidos solubles__(SS); Resistencia de pulpa al penetrómetro (kgf/cm^2); Palatabilidad;__Color del jugo; Incidencia de la marchites vascular (*Fusarium oxysporum*); Presencia de Barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*); Incidencia y Severidad de nematodos (*Meloidogyne incognita*); Población de Nematodos (*Meloidogyne incognita*)

2.2.2.4. Resultados y discusión

Caracterización Agro-morfológica de la Colección

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de los descriptores agronómicos y morfológicos evaluados en la colección de naranjilla del Programa de Fruticultura-INIAP, se detallan a continuación:

Agrupamiento de la Colección

La consecuencia del Agrupamiento Jerárquico de Ward (1963) obtenido a partir de la matriz de distancia formada por el algoritmo de Gower (1967) (Anexo A) muestra las relaciones entre los pares génicos de los materiales evaluados, ellas contienen distancias que son muy próximas o similares entre las accesiones que van a ser representados por el Dendograma en la Colección de Naranjilla (*S. quitoense* Lam.) del INIAP, Programa de Fruticultura, en donde se identificó **tres conglomerados o grupos** en 58 materiales que corresponden al 100% de los materiales evaluados en la colección, obteniéndose en el Grupo # 1, con 38

materiales, el Grupo # 2 con 19 materiales y el Grupo # 3 conformado por 1 material.

En el cuadro 1 observamos la formación de tres grupos, los cuales en el grupo # 2 y # 3, tenemos la formación de subgrupos que se relacionan entre los materiales lo cual nos indica que cada uno de estos, tiene características agronómicas o morfológicas muy similares ya que son fruto de cruzamientos con especies de la sección Lasiocarpa.

Cuadro 1. Materiales pertenecientes a los grupos formados del análisis jerárquico de ward, en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Código	Cruzamientos	Grupos Morfológicos
GTP1	*S.quitoense x S vestissimum*	**Grupo 1**
GTP11	*4n Puyo x 4n Palora DC P1-1*	
GTP16	*S quitoense var.Baeza*	
GTP17	*S.quitoense var. Dulce x S.vestissimum*	
GTP2	*S.quitoense x S hyporhodium*	
GTP20	*(S.quitoense x S.hyporhodium) S.quitoense var.Dulce*	
GTP21	*S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense*	
GTP23	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense var.dulce (estaca)*	
GTP24	*Desconocido (PGV-24)*	
GTP25	*S.quitoense x S.hyporhodium (estaca)*	
GTP28	*S.quitoense x S.hyporhodium x S.quitoense var.dulce (estaca)*	
GTP29	*S.quitoense x S.vestissimum (estaca)*	
GTP3	*S. quitoense var.Peluda x S.vestissimum*	
GTP30	*S.quitoense var.Peluda x S.quitoense var.Dulce x S.vestissimum*	
GTP31	*S.quitoense x S.hyporhodium (estaca)*	
GTP32	*S.hyporhodium x S.quitoense var.Dulce*	
GTP36	*S. quitoense var.Baeza x S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP38	*S.quitoense x S.hyporhodium F1 x S.quitoense F1*	
GTP5	*(S.quitoense x S.hyporhodium) S.quitoense var.dulce*	
GTP9	*S.vestissimum x S.quitoense F1)x S.quitoense BF1*	
GTP40P1F12	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense var.Dulce*	
GTP41P2F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP41P3F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP41P4F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP41P5F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP41P6F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP41P7F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	

GTP42P1F2	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP42P1F3	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP42P2F2	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP42P3F2	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP42P4F2	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP42P5F2	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP43P1F4	*S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP43P4F4	*S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP43P5F4	*S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP45P2F6	*S.quitoense var.Peluda*	
GTP45P4F6	*S.quitoense var.Peluda*	
GTP14	*S.vestissimum x S.quitoense F1) (S.quitoense F1)*	
GTP15	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense*	
GTP18	*S.quitoense var.Dulce x S.vestissimum (estaca)*	
GTP26	*S.vestissimum x S.quitoense F1 x S.quitoense FB1*	
GTP33	*S.vestissimum x S.quitoense F1)x S.quitoense BF1*	
GTP37	*4n Palora x 4n Puyo (E x P)*	
GTP39	*S.quitoense x S.vestissimum (semilla)*	
GTP6	*(S.vestissimum x S.quitoense F1) (S.quitoense F1B1)*	
GTP7	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense*	
GTP40P2F12	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense var.Dulce*	**Grupo 2**
GTP40P4F12	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense var.Dulce*	
GTP40P5F12	*(S.quitoense x S.hyporhodium) x S.quitoense var.Dulce*	
GTP41P1F1	*(S.quitoense x S.hyporhodium)*	
GTP42P3F3	*S.quitoense var. Dulce x S.vestisssimum*	
GTP43P2F4	*S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP43P3F4	*S.quitoense x S.vestissimum*	
GTP45P1F6	*S.quitoense var.Peluda*	
GTP46P1F8	*S.quitoense var.Baeza*	
GTP46P2F8	*S.quitoense var.Baeza*	
GTP22	*4n Puyo x 4n Palora*	**Grupo 3**

En el Cuadro 1, tenemos los 58 materiales que fueron evaluados de toda la colección que se plantó en campo, cada uno pertenece al grupo morfológico de acuerdo las características que fueron muy similares dentro de ellos.

Valores Discriminantes en los Caracteres

Los parámetros estadísticos usados para la selección de los descriptores discriminantes cualitativos y cuantitativos se detallan a continuación.

Caracteres Cuantitativos

Cuadro 2. Parámetros usados para la estimación del valor discriminante en caracteres cuantitativos de la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Caracteres	X²	Pi	Cramer´s V
Inicio de Floración [a]	81,66 **	1,19	0,84
Cuajado de frutos	101,05 **	1,32	0,94
Madurez Fisiológica	111,42 **	1,39	0,98
Altura Planta	97,68 **	1,29	0,92
Diámetro tallo	109,13 *	1,37	0,97
Flor masculina	23,61 ns	0,64	0,45
Flor femenina	23,26 ns	0,63	0,45
Número de Inflorescencias	21,28 ns	0,6	0,43
Flores/inflorescencias	77,81 **	1,16	0,82
Frutos/inflorescencias	11,05 ns	0,44	0,31
% Fructificación	98,45 **	1,3	0,92
Frutos Caídos	9,64 ns	0,41	0,99
Frutos Cosechados	10,37 ns	1,37	0,97
Peso del Fruto	92,34 **	1,26	0,89
Diámetro de fruta	97,84 **	1,3	0,92
Resistencia Penetrómetro	39,95 *	0,83	0,59
Grados Brix	45,51 *	0,92	0,65
Rendimiento/planta	106,48 **	1,36	0,96
Incidencia Fusarium	61,8 *	1,03	0,73
Incremento Nematodos	10,01 ns	0,42	0,29
Incidencia del Perforador	35,52 *	0,78	0,55

[a] Carácter de mayor valor discriminante
** Altamente significativo al 1% de probabilidad
* Significativo al 5% de probabilidad
ns No significativo

En el Cuadro 2, se detallan los resultados de la prueba de X² para determinar cuál de los descriptores es el más discriminante, consiguiendo así, nueve caracteres altamente significativos al 1 %, cinco significativos al 5 % y siete caracteres no significativos, además se obtuvo el coeficiente de asociación (Pi) y Cramer`s (V) de los caracteres cuantitativos.

Se establecieron nueve caracteres discriminantes por ser altamente significativos según la prueba de Chi cuadrado y son: Inicio de Floración (81.66 días), Madurez Fisiológica del Fruto (101.05 días), Cuajado de Frutos (111.42 días), Altura de planta (97.68 m), Flores por Inflorescencia (77.80 flores), Porcentaje de Fructificación (98.45 %), Peso del Fruto (92.34 g), Diámetro del Fruto (97.84 mm),

Rendimiento por Planta (106.48 kg/plt), confirmando que estos descriptores son convenientes para la caracterización morfológica de germoplasma de naranjilla.

Según la prueba de Cramer´s los descriptores de mayor valor fueron: Número de frutos caídos (0.99), Madurez Fisiológica del fruto (0.98), Diámetro del tallo (0.97), Frutos cosechados (0.97), Rendimiento/planta (0.96) y Cuajado de frutos (0.94) los que establecen una alta contribución para separar grupos genéticos. Se evaluaron 21 caracteres cuantitativos, los mismos que no presentaron discriminancia alguna para separar los grupos.

Cabe mencionar que para el descriptor Rendimiento/planta, los datos se tomaron durante todo el tiempo cosecha mientras la colección estuvo en buen estado y tuvo un periodo de nueve meses de donde se pudo obtener la información necesaria para la caracterización.

Caracteres Cualitativos

Cuadro 3. Frecuencia relativa del análisis de agrupamiento jerárquico de ward según los caracteres cualitativos de alto poder discriminante en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Caracteres Cualitativos		Grupos Jerárquicos					Total	X^2
		Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		
		N	%	N	%	%	%	
Presencia de espinas	no	19	52,78	16	44,44	2,78	100,00	6.92
	si	19	86,36	3	13,64	0,00	100,00	
Espinas en Haz	no	21	55,26	16	42,11	2,63	100,00	5,23
	si	17	85	3	15	0,00	100,00	
Espinas en Envés	no	22	57,89	15	39,47	2,63	100,00	3,02
	si	16	80,00	4	20	0,00	100,00	
Espinas en Nervadura	no	21	56,76	15	40,54	2,70	100,00	3,65
	si	17	80,95	4	19,05	0,00	100,00	
Color de Hoja	Verde Claro	25	78,13	7	21,88	0,00	100,00	5,54
	Verde Oscuro	13	50,00	12	46,15	3,85	100,00	
Color de Nervadura	Verde Claro	2	40,00	2	40	20,00	100,00	13,38
	Violeta	36	69,23	16	30,77	0,00	100,00	
Forma del	Esférico	19	55,88	14	41,18	2,94	100,00	4,21

Fruto	Ovalado	14	87,50	2	12,50	0,00	100,00	
Color de la Pulpa	Verde Oscuro	18	100,00	0	0,00	0,00	100,00	24,25
	Verde Claro	4	19,05	17	80,95	0,00	100,00	
Aroma del Jugo	Excelente	19	63,33	10	33,33	3,33	100,00	1,18
	Muy Bueno	18	66,67	9	33,33	0,00	100,00	
Sabor del Jugo	Dulce	12	63,16	7	36,84	0,00	100,00	2,44
	Agridulce	9	50,00	9	50,00	0,00	100,00	
	Agrio	5	100,00	0	0,00	0,00	100,00	
Tamaño del Fruto	Mayor 6.5	0	0,00	0	0,00	100,00	100,00	20,14
	6 - 6.4	25	67,57	12	32,43	0,00	100,00	
	Menor 6.5	13	65,00	7	35,00	0,00	100,00	

En los diez caracteres cualitativos discriminantes evaluados (Cuadro 3), resultaron altamente significativos según la prueba de **X^2** pues expresa la variabilidad dentro de cada grupo. Los descriptores cualitativos están constituidos por varios estados que expresan la variabilidad de la colección esta relación de los agrupamientos con los estados de los caracteres de mayor poder discriminante permite comprender con facilidad la naturaleza de los materiales dentro de cada agrupamiento. Los descriptores como la presencia de espinas en el tallo, presencia de espinas en el haz de la hoja, presencia de espinas en el envés de la hoja, espinas en la nervadura pueden ser una característica de interés debido a las dificultades para la cosecha. Es en este sentido que se deben hacer trabajos para que esto no sea un problema para el agricultor.

El color de la hoja, el color de la nervadura y la forma del fruto presentan un alto valor en el **X^2** (5.54, 13.38 y 4.21 respectivamente) debido a que cada material proviene de materiales silvestres, estos poseen un color característico que los diferencia del resto y es por eso que hay marcados contrastes entre ellos. Para el color de la pulpa, presencia de aroma y el sabor de la fruta son características de importancia por el valor comercial y que son parte del establecimiento de parámetros en la calidad para el consumidor local e internacional, en el caso particular del color de la pulpa observamos que el **X^2** es alto y esto responde a que como dijimos anteriormente, estos provienen de cruzamientos con materiales silvestres que tienen marcada variabilidad en el color de la pulpa que genéticamente vienen predispuestos a mostrar una variación en el color a esto hay que añadir la presencia de factores externos como del medio ambiente en donde algunos seres vivos juegan un papel importante en la hibridación natural que ocurre en la naturaleza diariamente.

Con el análisis de los descriptores cualitativos más discriminantes, a continuación se realiza una relación en cada uno en los tres Grupos formados.

a) **Presencia de Espinas en el Tallo**

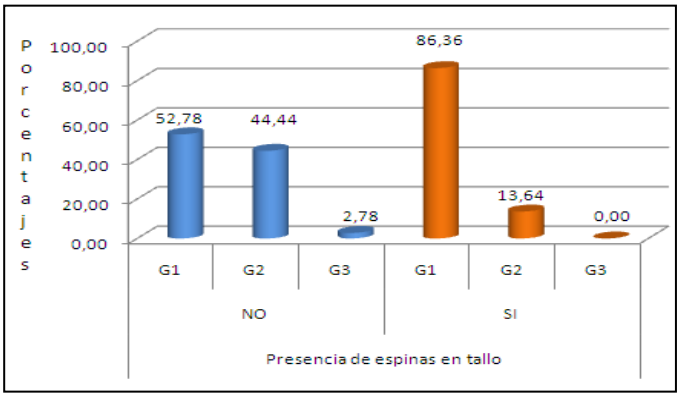


Gráfico 9. Porcentajes de la presencia o ausencia de espinas en el tallo en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados sin espinas el Grupo 1 tiene 52.78 %, para el Grupo 2 con un 44.44 % y el Grupo 3 con 2.78 %. De los materiales con espinas, el Grupo 1 presentó el 86.36 % y en el grupo 2 con el 13.64 %. (Gráfico 9).

b) Espinas en el Haz de la Hoja

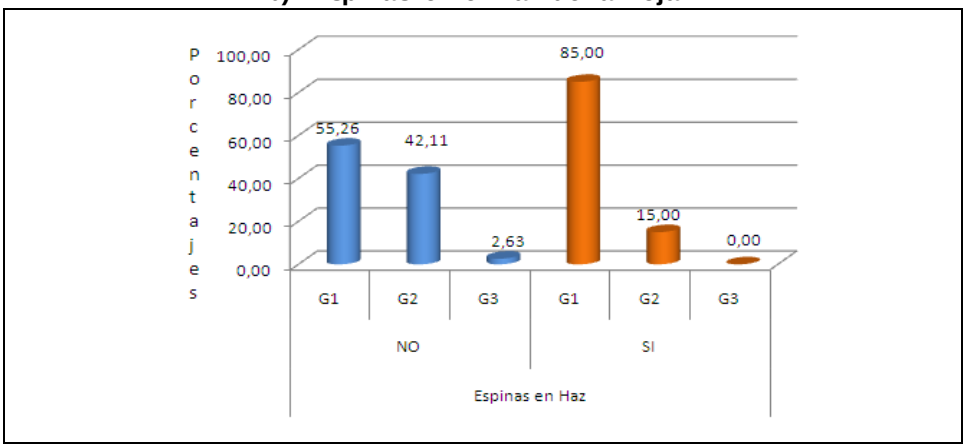


Gráfico 10. Porcentajes de la presencia o ausencia de espinas en el haz de la hoja en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados sin espinas en el haz de la hoja, el Grupo 1 tiene 55,26 %, para el Grupo 2 con un 42.11 % y el Grupo 3 con 2.63 %. De los materiales con espinas, el Grupo 1 presentó el 85.00 % y en el grupo 2 con el 15.00 %. (Gráfico 10).

c) Espinas en el Envés de la Hoja

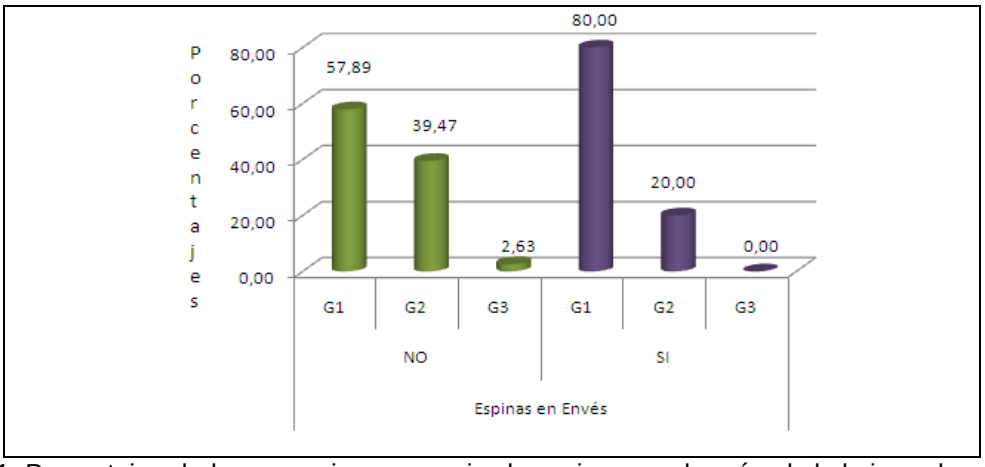


Gráfico 11. Porcentajes de la presencia o ausencia de espinas en el envés de la hoja en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados sin espinas en el envés de la hoja, el Grupo 1 tiene 57.89 %, para el Grupo 2 con un 39.47 % y el Grupo 3 con 2.63 %. De los materiales con espinas, el Grupo 1 presentó el 80.00 % y en el grupo 2 con el 20.00 %. (Gráfico 11).

d) Espinas en la Nervadura en la Hoja

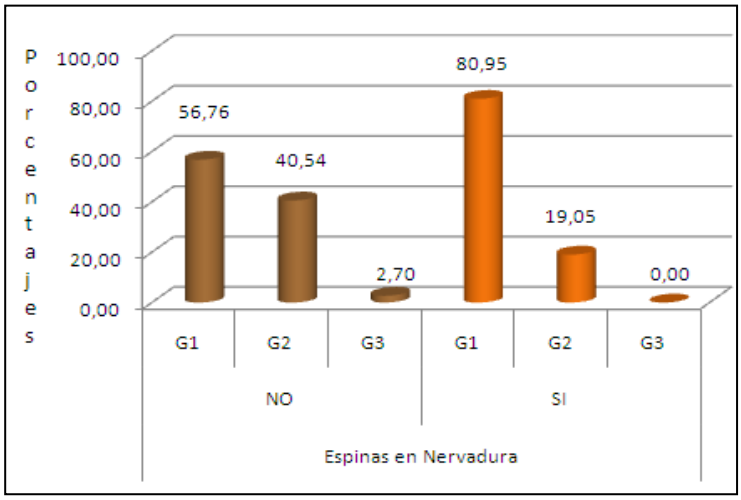


Gráfico 12. Porcentajes de la presencia o ausencia de espinas en la nervadura de la hoja en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados sin espinas en la nervadura de la hoja, el Grupo 1 tiene 56.76 %, para el Grupo 2 con un 40.54 % y el Grupo 3 con 2.70 %. De los materiales con espinas, el Grupo 1 presentó el 80.95 % y en el grupo 2 con el 19.05 %. (Gráfico 12). Según Vivar (1968), la ausencia o presencia de espinas en las diferentes estructuras de la naranjilla es de carácter hereditario de acuerdo con los materiales que se hayan hecho los retrocruzamientos, la presencia de espinas

se muestra como dominante a comparación de la ausencia, se considera tentativamente que el carácter “espinas” es de herencia simples o de herencia monogénica.

e) Color de la Hoja

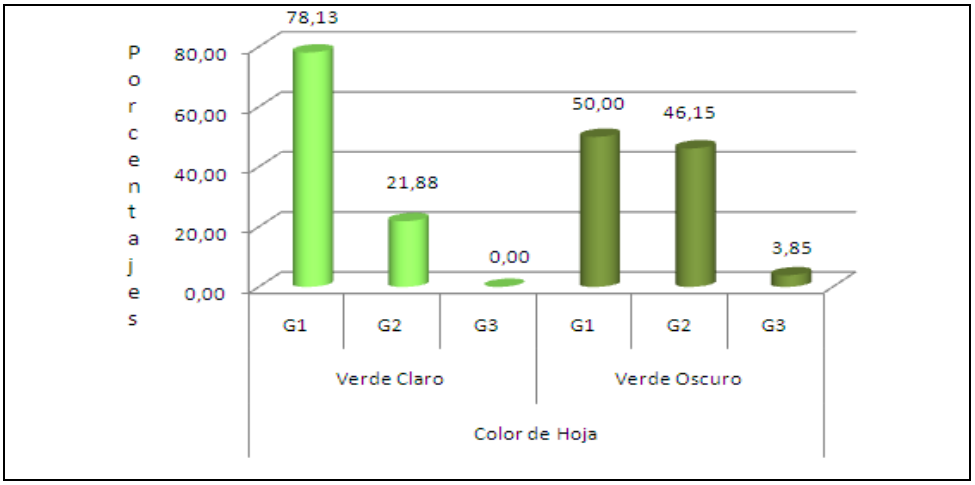


Gráfico 13. Porcentajes del color en la hoja para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados el color verde claro en la hoja, el Grupo 1 tiene 78.13 %, para el Grupo 2 con un 21.88 %. De los materiales con un color verde oscuro en la hoja, el Grupo 1 presentó el 50.00 %, el grupo 2 con el 46.15 % y el Grupo 3 con el 3.85 %. (Gráfico 13).

f) Color de la Nervadura de la Hoja

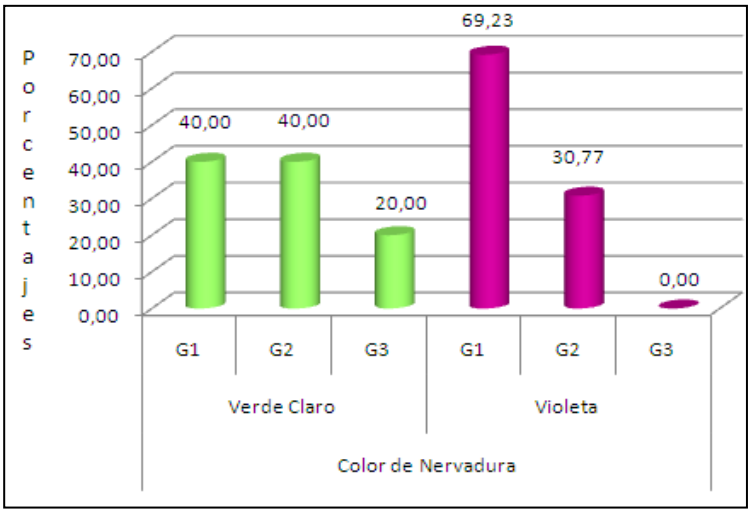


Gráfico 14. Porcentajes del color de la nervadura de la hoja para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados el color verde claro en la nervadura de la hoja, el Grupo 1 tiene 40.00 %, el Grupo 2 con un 40.00 % y el Grupo 3 con el 20.00 %.

De los materiales con el color Violeta en la nervadura de la hoja, el Grupo 1 presentó el 68.23 % y el grupo 2 con el 30.77 %. (Gráfico 14). El color de las hojas y las nervaduras son un carácter que muestra la diferencia entre los materiales así, el hibrido Puyo presenta hojas y nervadura de color verde claro a diferencia de la naranjilla de jugo o Baeza que tiene un color verde oscuro intenso y con el color de la nervadura violeta hace que en varios materiales se presentes estas diferencias debido a la proveniencia según sus progenitores.

g) Forma del Fruto

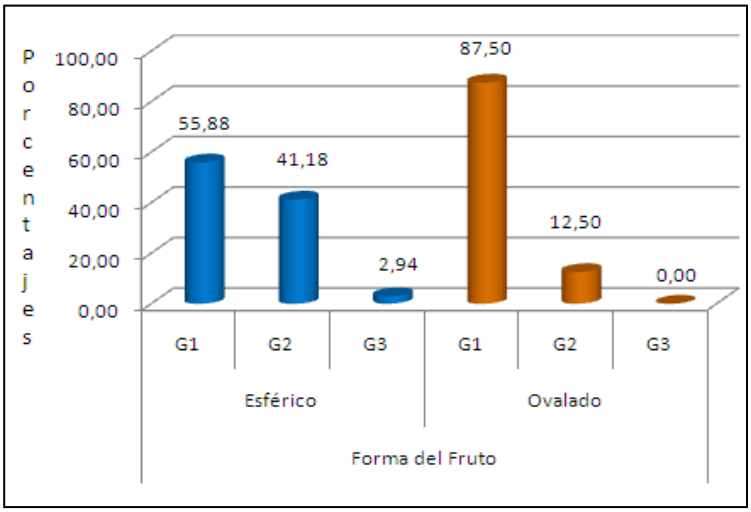


Gráfico 15. Porcentajes de la Forma del Fruto para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados la forma de la fruta esférica, el Grupo 1 tiene 55.88 %, para el Grupo 2 con un 41.18 % y en el Grupo 3 con un 2.94 %. De los materiales con la forma ovalada del fruto, el Grupo 1 presentó el 87.50 % y el Grupo 2 con el 12.50 %. (Gráfico 15). La variabilidad genética de la sección Lasiocarpa, nos muestra la diversidad en sus frutos, el hibrido puyo muestra un fruto de forma redonda, a comparación de la Baeza que es un poco achatada en sus polos es por eso que hay materiales que tienen características intermedias por la variabilidad.

h) Color de la Pulpa del Fruto

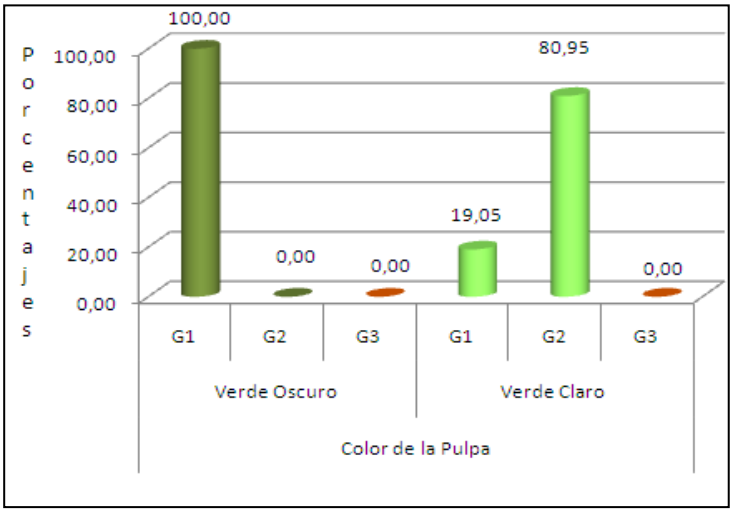


Gráfico 16. Porcentajes del color de la pulpa del fruto para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados del color de la pulpa verde, el Grupo 1 tiene el 100.00 %. De los materiales con un color de la pulpa verde claro, el Grupo 1 presentó el 19.05 % y el Grupo 2 con el 80.95 %. Para el caso del Grupo 3, el color de la pulpa de este material es muy característico ya que se diferencia de los demás grupos, su color es anaranjado gracias a uno de sus progenitores (variedad *Palora)* se ha mantenido como dominante en esta característica. (Gráfico 16).

i) Aroma del Jugo

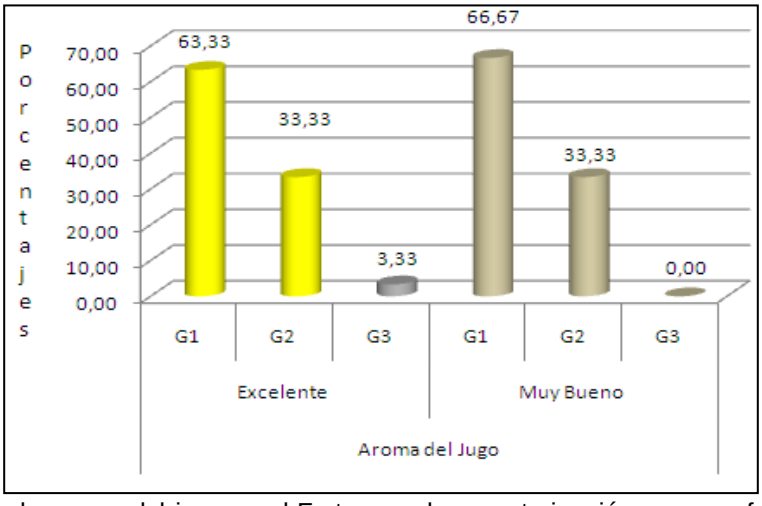


Gráfico 17. Porcentajes de aroma del jugo en el Fruto para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados en la presencia de aroma del jugo excelente, el Grupo 1 tiene 63.33 %, para el Grupo 2 con un 33.33 % y en el Grupo 3 con un 3.33 %. De los materiales con el aroma del fruto muy bueno, el Grupo 1 presentó el 66.67 % y el Grupo 2 con el 3.33 %. En el Grupo 3, el aroma del jugo fue regular

debido a que aún conserva la característica de sus progenitores que en cuanto al aroma del fruto sigue siendo regular o malo. (Gráfico 17).

j) Sabor del Jugo

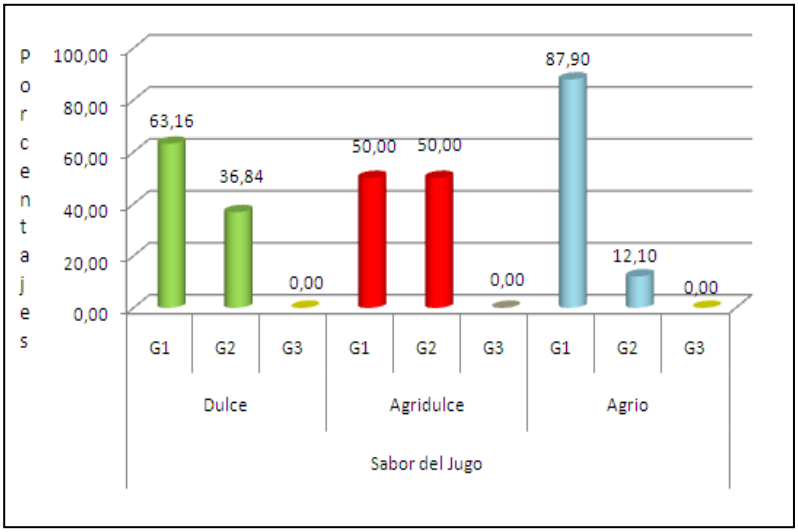


Gráfico 18. Porcentajes del sabor del Fruto para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Del total de materiales evaluados sabor del jugo dulce del fruto, el Grupo 1 tiene 63.16 % y para el Grupo 2 con un 36.84 %. De los materiales con sabor agridulce, el Grupo 1 presentó el 50.00 % y el Grupo 2 con el otro 50.00 %. Para el sabor agrio del jugo, el Grupo 1 tiene el 87.90 % y el Grupo 2 con el 12.10 %. En el caso del Grupo 3, este no pertenece a ninguna de las alternativas propuestas ya que su sabor característico debido a sus parentales es el sabor amargo. (Gráfico 18).

Cuadro 4. Parámetros para la evaluación de la variabilidad genética en las variables cuantitativas para la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009**.**

Carácter	Mínimo	Máximo	Promedio	Desviación Estándar
Inicio de Floración (días)	103	298	203,59	37,97
Madurez Fisiológica (días)	136	318	229,43	39,74
Cuajado de frutos (días)	179	337	257,36	39,10
Altura Planta (m)	1,01	2,48	1,87	0,24
Diámetro tallo (mm)	2,5	7,8	4,35	1,05
Flor masculina	1	11	5,52	2,10
Flor femenina	1	12	5,59	2,70
Número de Inflorescencias	9	20	14,95	2,61
Flores/inflorescencias	5	26	13,72	3,68
Frutos/inflorescencias	2	11	5,84	2,32
% Fructificación	15	87,5	44,57	18,57

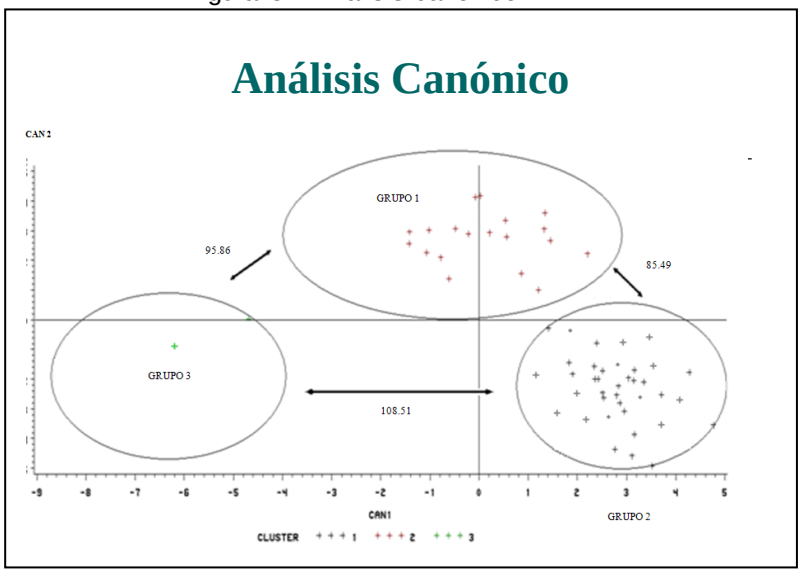
Frutos Caídos	0	5	1,40	1,04
Frutos Cosechados	1	335	88,60	77,53
Diámetro de fruta (mm)	27,9	64	51,73	7,06
Resistencia Penetrómetro (kg/lb)	1,9	10	5,20	2,63
Sólidos solubles (grados brix)	6,8	17	12,03	1,81
Rendimiento/planta (kg/plt)	0,03	25,13	6,06	5,42
Incidencia Fusarium (%)	1	6	3,00	2,21
Incremento Población Nematodos	0	3,2	0,47	0,62
Incidencia del Perforador (%)	8	94,7	53,41	22,49

En el Cuadro 4, se presenta el promedio de la desviación estándar que al evaluar 21 caracteres cuantitativos, se obtuvo datos menores, entre menor sea más similares serán los genotipos en los grupos correspondientes del conjunto de caracteres, es por eso que los datos obtenidos son muy homogéneos. La desviación estándar promedio para las variables cuantitativas fue de 13.54, el *número de frutos cosechados* tuvo la más alta variación con 39.74 y un promedio de 88.60 frutos y la Altura de planta con la menor varianza de 0,24 con un promedio de 1,87 m.

Análisis Canónico

Se muestra la ubicación espacial de las entradas basadas en ecuaciones construidas a partir del coeficiente de Gower en el análisis discriminante canónico y las distancias de Mahalanobis

Figura 81. Análisis canónico



La variable CAN 1 muestra el 50% de la variabilidad genética y separa al Grupo 1 del Grupo 2, a una distancia de 11,683 mientras que la variable CAN 2 representa el 50% de la variabilidad restante separando a los grupos Grupo 1 y Grupo 3 a una distancia de 16,304 siendo los grupos más alejados. Se observa también que el

Grupo 2 y Grupo 3 son los más relacionados pues muestran una distancia de 9,595.

Análisis de los Agrupamientos

El análisis de agrupamiento Jerárquico de Ward formó tres grupos de entradas cada uno con sus respectivos Morfotipos que a continuación, las características se detallan en cada grupo formado.

GRUPO 1

Se obtuvieron 38 entradas en este grupo en donde se identificaron siete morfotipos las cuales provienen de la parroquia de Nanegalito, en la zona de La Armenia, Provincia de Pichincha y sus características son (Cuadro 5):

Cuadro 5. Características agro - morfológicas del grupo 1 en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

GRUPO 1					
Descriptor Cuantitativo				**Descriptor Cualitativo**	
	Min	**Máx**	**X**		
Inicio de Floración (días)	103	281	199,87	Presencia de espinas Tallo	SI
Cuajado de Frutos (días)	136	311	225,5	Espinas en Haz	NO
Madures Fisiológica Fruto (días)	192	333	255,71	Espinas Envés	SI
Altura de planta (metros)	1,45	2,25	1,87	Espinas en Nervadura	SI
Flores x Inflorescencia (flores)	5	26	14,26	Color de Hoja	Verde Claro
Porcentaje de Fructificación (%)	17,6	87,5	46	Color de Nervadura	Violeta
Peso de Frutos (g)	30	130	74,83	Forma del Fruto	Ovalado
Diámetros de frutos (mm)	36	64	51,61	Color de la Pulpa	Verde Oscuro
Rendimiento planta (kg/plt)	0,03	25,1	6,35	Aroma de Jugo	Muy Bueno
				Sabor del Jugo	Agrio

GRUPO 2

Las 19 entradas ubicadas en este Grupo, igualmente pertenecen al mismo sitio de La Armenia, Provincia de Pichincha, la misma que se observan sus características principales fueron (Cuadro 6):

Cuadro 6. Características agro - morfológicas del grupo 2 en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

GRUPO 2					
Descriptor Cuantitativo				**Descriptor Cualitativo**	
	Min	**Máx**	**X**		
Inicio de Floración (días)	120	298	211,68	Presencia de espinas Tallo	NO
Cuajado de Frutos (días)	145	318	238,53	Espinas en Haz	NO
Madures Fisiológica Fruto (días)	179	337	206,47	Espinas Envés	NO
Altura de planta (metros)	1,01	2,48	1,85	Espinas en Nervadura	NO
Flores x Inflorescencia (flores)	6	19	12,32	Color de Hoja	Verde Oscuro
Porcentaje de Fructificación (%)	26,7	80	43,28	Color de Nervadura	Verde Claro
Peso de Frutos (g)	50	112	75,83	Forma del Fruto	Esférico
Diámetros de frutos (mm)	27,9	60,5	51,43	Color de la Pulpa	Verde Claro
Rendimiento planta (kg/plt)	0,32	20,5	5,28	Aroma de Jugo	Bueno
				Sabor del Jugo	Agridulce

GRUPO 3

En este grupo solo se encontró un solo material y sus características más relevantes según nuestro análisis, entradas de las cuales provienen asimismo de la parroquia de Nanegalito, exactamente en La Armenia, Provincia de Pichincha con sus características principales fueron (Cuadro 7).

Cuadro 7. Características agro - morfológicas del grupo 3 en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

GRUPO 3			
Descriptor Cuantitativo		**Descriptor Cualitativo**	
Inicio de Floración (días)	191	Presencia de espinas Tallo	NO
Madures Fisiológica Fruto (Días)	206	Espinas en Haz	NO
Cuajado de Frutos (Días)	261	Espinas Envés	NO
Altura de planta (metros)	1,9	Espinas en Nervadura	NO
Flores x Inflorescencia (Flores)	20,0	Color de Hoja	Verde Amarillento
Porcentaje de Fructificación (%)	65,0	Color de Nervadura	Verde Claro
Peso de Frutos (g)	145,8	Forma del Fruto	Esférico
Diámetro de frutos (mm)	62,2	Color de la Pulpa	Verde Anaranjado
Rendimiento por planta (kg/plt)	9,5	Aroma de Jugo	Regular
		Sabor del Jugo	Amargo

Análisis de los Datos

Del análisis de agrupamiento jerárquico de Ward, tenemos comparaciones entre algunos caracteres que nos muestran las diferencias entre los grupos.

Cuadro 8. Comparaciones entre el inicio de floración, cuajado de fruto y madurez fisiológica de frutos en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Inic_florac	Cuaj_frut	Mad_Fis_frut
Grupo 1	Población	38	38	38
	Promedio	199,87	225,5	255,71
	Mínimo	103	136	192
	Máximo	281	311	333
	Desviación estándar	38,25	38,43	37,83
Grupo 2	Población	19	19	19
	Promedio	211,68	238,53	260,47
	Mínimo	120	145	179
	Máximo	298	318	337
	Desviación estándar	38,10	42,61	43,41
Grupo 3	Población	1	1	1
	Promedio	191	206	261
	Mínimo	191	206	261
	Máximo	191	206	261

	Desviación estándar	.	.	.

En el Cuadro 8, se observa que en el Grupo 1 tenemos al inicio de floración con 199.87 días, el cuajado de frutos de 225.5 días y la madures fisiológica del fruto con 255.71 días con una desviación estándar promedio de 38.17. En el Grupo 2 tenemos que el inicio de floración con 211.68 días, el cuajado de frutos de 238.53 días y la madures fisiológica del fruto con 260.47 días con una desviación estándar promedio de 41.37

Para el Grupo 3 se presenta con un solo material con un inicio de floración con 199.87 días, el cuajado de frutos de 225.5 días y la madures fisiológica del fruto con 255.71 días. Además se observa que el Grupo 1 tiene menos días al Inicio de floración (199.87 días), Cuajado de frutos (225.5 días) y Madurez fisiológica de frutos (255.71 días), con coeficientes de variación de 38.25%; 38.43% y 37.83% respectivamente, estos datos indica que los materiales que pertenecen a este grupo tienen mejor disposición en campo que los otros dos grupos restantes, teniendo así materiales que se pueden utilizar para reducir el número de días en la producción de fruta por planta, mucho antes que los híbridos que se comercializan en los mercados actualmente.

Cuadro 9. Relaciones entre el largo y ancho de la hoja con el rendimiento por planta en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Largo hoja (cm)	Ancho hoja (cm)	Rend/plt (kg/plt)
Grupo 1	Población	38,00	38,00	38,00
	Promedio	31,21	29,16	6,35
	Mínimo	.00	.00	0.03
	Máximo	62.00	56.00	25.13
	Desviación estándar	151,00	139,00	579,18
Grupo 2	Población	19,00	19,00	19,00
	Promedio	20,13	18,85	5,28
	Mínimo	.00	.00	0.32
	Máximo	44.56	44.21	20.50
	Desviación estándar	156,70	150,46	476,56
Grupo 3	Población	1,00	1,00	1,00
	Promedio	47,00	44,15	9,50
	Mínimo	47.00	44.15	9.50
	Máximo	47.00	44.15	9.50
	Desviación estándar	.	.	.

En el Cuadro 9, tenemos que el Grupo 1 presenta un largo y ancho de la hoja de 31.21 cm y 29.16 cm respectivamente con un rendimiento por planta de 6.35 kg., con una desviación estándar de 145; el Grupo 2 hay un largo y ancho de la hoja de 20.13 cm y 18.85 cm respectivamente y un rendimiento por planta de 5.28 kg., la desviación estándar fue de 153.58 y el Grupo 3 nos muestra un largo de la hoja de 47.00 cm, un ancho de la hoja de 44.15 cm., rendimiento de 9.5 kg/plt.

Se observa además que el grupo 3 presenta mejores resultados así tenemos:

El largo de la hoja (47.00 cm) y ancho de la hoja (44.15 cm) está relacionada directamente con el aumento en el rendimiento por planta (9.5 kg/plt); el grupo 3 presenta rendimientos mejores en comparación al Grupo 1 (6,35 kg/plt) y el Grupo 2 (5.28 kg/plt)., la forma de reproducción asexual o reproducción por estaca, acelera los procesos fisiológicos de crecimiento o aumento de tamaño de sus estructuras, lo que provoca un rápido desarrollo de las células en este caso en células de la hoja haciendo que los nutrientes, la cantidad de agua y luz sean absorbidos de mejor forma por la planta gracias a una amplia superficie de la hoja, viéndose así reflejada en los altos niveles de producción de fruta, estos además los incrementos en los tamaños de hojas tienen relación en algunos casos con el manejo agronómico, los factores climáticos y variabilidad genética de la planta. (Vivar, H., 1968)

Cuadro 10. Relación entre el número de flores por inflorescencia con el porcentaje de fructificación en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Flor/inflor (nº)	Fructific (%)	Frut_cosech (nº)
Grupo 1	Población	38	38	38
	Promedio	14,26	46	90,55
	Mínimo	5	17,6	1
	Máximo	26	87,5	330
	Desviación estándar	3,57	19,3	81,82
Grupo 2	Población	19	19	19
	Promedio	12,32	43,28	84,32
	Mínimo	6	26,7	1
	Máximo	19	80	335
	Desviación estándar	3,45	16,48	72,4
Grupo 3	Población	1	1	1
	Promedio	20	65	96
	Mínimo	20	65	96

	Máximo	20	65	96
	Desviación estándar	-	-	-

En la Cuadro 10, se muestra en el Grupo 1 tiene el número de inflorescencias de 14.26, el porcentaje de fructificación de 46.00 % y los frutos cosechados de 90.55 con desviaciones estándares de 14.26 %, 46.00 % y 90.55 % respectivamente, en el grupo 2, el número de inflorescencias con 12.32, el porcentaje de fructificación de 43.28 % y los frutos cosechados de 84.32 con desviaciones estándares de 3.45 %, 16.48 % y 72.40 % respectivamente y el número de inflorescencias de 20.00, el porcentaje de fructificación de 65.00 % y los frutos cosechados de 96 para el grupo 3, este presenta mejores resultados en relación a los otros dos grupos; lo que indica que el manejo agronómico tiene que estar dirigido a mantener las flores con un cuidado especial en la planta, esto favorece al incremento de la producción aumentando la rentabilidad de los productores durante el periodo de cosecha obteniendo así más ganancias.

Cuadro 11. Relación entre el diámetro del fruto con el peso del fruto en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Diám_frut (mm)	Peso_frut (g)
Grupo 1	Población	38,00	38,00
	Promedio	51,61	74,83
	Mínimo	36,00	30,00
	Máximo	64,00	130,00
	Desviación estándar	6,68	23,96
Grupo 2	Población	19,00	19,00
	Promedio	51,43	75,83
	Mínimo	27,90	50,00
	Máximo	60,50	112,00
	Desviación estándar	7,74	17,08
Grupo 3	Población	1,00	1,00
	Promedio	62,00	145,00
	Mínimo	62,00	145,00
	Máximo	62,00	145,00
	Desviación estándar	-	-

En el Cuadro 11, el grupo 1 presentó un diámetro del fruto de 51.61 mm., un 74.83 g de peso de la fruta; el grupo 2 mostró un diámetro de 51.43 mm y un peso de fruta de 75.83 g. en el grupo 3 obtuvo en el diámetro 62.00 mm y un peso de la fruta de 145 g., estos últimos son resultados excelentes en comparación a los

otros materiales. La relación del tamaño de la fruta con el peso se da con base la variabilidad genética de los materiales estudiados, en algunos de ellos a pesar de que su tamaño es grande, la cantidad de jugo, peso de las semillas y la cantidad de agua en la fruta, juega un papel relevante para que el peso sea bajo o alto.

Cuadro 12. Incidencia de *Fusarium oxysporum* en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Incidencia de *Fusarium spp.*						Total
		0%	20%	40%	60%	80%	100%	
Grupo 1	Población	19	1		3	8	7	38
	% del Total	50,00	2,60	-	7,90	21,10	18,40	100,00%
Grupo 2	Población	11			1	1	6	19
	% del Total	57,90	-	-	5,30	5,30	31,60	100,00%
Grupo 3	Población			1				1
	% del Total	-	-	100	-	-	-	100,00%

En el Cuadro 12, se observa la Incidencia de *Fusarium oxysporum*, en el Grupo 1, los 19 materiales presentaron susceptibilidad del 0 % que corresponde al 50 %, un material presentó susceptibilidad del 20 % que es el 2.60 %, 3 materiales presentaron susceptibilidad del 60 % correspondiente al 7.90 %, 8 materiales con susceptibilidad del 80 % correspondiente al 21.10 % y 7 materiales presentaron la susceptibilidad del 100 % que es el 18.40 % de los 38 materiales pertenecientes a este grupo; para el Grupo 2, los 11 materiales presentaron una susceptibilidad del 0 % con que corresponde el 57.90 %, un material muestra susceptibilidad del 60 % que corresponde al 5.30 %, un solo material presenta susceptibilidad del 80 % que es el 5.30 % y 6 materiales con susceptibilidad del 100 % correspondientes al 31.60 % de los 19 materiales pertenecientes a este grupo. En el grupo 3, el único material de este grupo presentó una susceptibilidad del 40 %.

Cuadro 13. Respuesta del rendimiento en relación a la presencia de plantas muertas con el incremento de la población nematodos (*meloidogyne incognita*) en la caracterización agro-morfológica de clones y segregantes de cruzamientos interespecíficos de naranjilla, 2009.

Grupos Morfológicos		Plantas Atacadas		Incr_Población (larvas /g de raíz)	Rendimiento por Planta (kg/plt)
		SI	NO		
Grupo 1	Población	1	37	38,00	38,00
	Promedio			0,47	6,35
	Mínimo			0,00	0,03
	Máximo			1,80	25,13
	Desviación estándar			0,54	5,79

Grupo 2	Población	3	16	19,00	19,00
	Promedio			0,48	5,28
	Mínimo			0,00	0,32
	Máximo			3,20	20,50
	Desviación estándar			0,78	4,77
Grupo 3	Población	1	-	1,00	1,00
	Promedio			0,00	9,50
	Mínimo			0,00	9,50
	Máximo			0,00	9,50
	Desviación estándar			-	-

En el Cuadro 13, se observa que el grupo 1 tiene el ataque de nematodos (*Meloidogyne incognita*) en solo material, con un incremento en la población de nematodos de 0.47 larvas / g de raíz y un rendimiento de 6.35 kg/plt. Para el grupo 2 hay la presencia del ataque de nematodos en 3 plantas con el incremento de población de 0.48 larvas / g de raíz y con 5.28 kg/plt. En el grupo 3 solo un material fue atacado por esta plaga, con un incremento de la población de 1.00 larvas / g de raíz, con un rendimiento de 9.5 kg/plt.

Identificación de los materiales promisorios

La evaluación Agro – morfológica de 41 materiales en estudio, nos permitió identificar posibles materiales promisorios dentro de la colección de Naranjilla (*S. quitoense* Lam.) del Programa de Fruticultura - INIAP, Ecuador en el 2008.
En la selección de los materiales promisorios se tomó atención a los descriptores de rendimiento relacionados con la susceptibilidad al ataque de *Fusarium oxysporum* y la tolerancia a la presencia de Nematodos (*Meloidogyne incognita*), además características como son: Forma, peso, diámetro, aroma, sabor, color de la pulpa del fruto que son demandadas en el mercado nacional e internacional.

Como materiales promisorios se ha identificado las siguientes cruzamientos: en el Grupo 1: **GTP 30** (*Solanum quitoense* var. Peluda x [*Solanum quitoense* var. Dulce x *Solanun vestisssimum*])**, GTP 36** (*Solanum quitoense* var. Baeza x [*Solanum quitoense* x *Solanum vestissimum*]). Con un rendimiento de 25.3 kg/plt y 21.9 kg/ plt respectivamente, además **GTP 42** y **GTP 43**.

Grupo 1					
Grupos Morfológicos	**Rend kg/plt**	**Color de la Pulpa**	**Diámetro del Fruto (mm)**	**Reacción de Incidencia *Fusarium* (Calificación)**	**Reacción de incremento de Nematodos (Calificación)**
GTP1	4,3	Verde Oscuro	51,62	Susceptible Alta	Hospedante deficiente
GTP11	3,57	Verde Oscuro	52,38	Susceptible Alta	Hospedante
GTP16	10,6	Verde Amarillento	64,28	Susceptible Media alta	No hospedante
GTP17	4,1	Verde Amarillento	44,12	Susceptible Alta	No hospedante
GTP2	10,3	Verde Oscuro	63,87	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP20	18,4	Verde Amarillento	52,16	Susceptible Media alta	Hospedante eficiente
GTP21	4,05	Verde Oscuro	61,52	Susceptible Alta	No hospedante
GTP23	0,03	Verde Oscuro	50,45	Susceptible Alta	No hospedante
GTP24	14,6	Verde Oscuro	57,45	Susceptible Baja	Hospedante eficiente
GTP25	3,4	Verde Claro	41,83	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP28	1,92	Verde Oscuro	40,25	Resistente	Hospedante eficiente
GTP29	0,53	Verde Oscuro	61,24	Susceptible Alta	Hospedante
GTP3	5,1	Verde Amarillento	49,25	Susceptible Media alta	Hospedante eficiente
GTP30	25,13	Verde Oscuro	42,32	Resistente	No hospedante
GTP31	11,7	Verde Amarillento	48,28	Susceptible Alta	No hospedante
GTP32	11,6	Verde Claro	59,24	Susceptible Alta	No hospedante
GTP36	21,9	Verde Claro	50,15	Resistente	Hospedante
GTP38	6,9	Verde Oscuro	54,56	Susceptible Muy alta	Hospedante
GTP40P1F12	4,5	Verde Claro	54,25	Susceptible Muy alta	Hospedante
GTP41P2F1	7,2	Verde Oscuro	50,24	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP41P3F1	0,8	Verde Oscuro	59,8	Susceptible Muy alta	Hospedante
GTP41P4F1	8,1	Verde Oscuro	46,4	Resistente	Hospedante
GTP41P5F1	4,3	Verde Claro	36,51	Resistente	Hospedante
GTP41P6F1	4,2	Verde Oscuro	42,3	Resistente	Hospedante eficiente
GTP41P7F1	4,4	Verde Oscuro	46	Resistente	Hospedante deficiente
GTP42P1F2	0,78	Verde Claro	51,05	Resistente	No hospedante
GTP42P1F3	5,4	Verde Amarillento	50,42	Resistente	Hospedante deficiente
GTP42P2F2	1,7	Verde Amarillento	55,7	Resistente	Hospedante eficiente
GTP42P3F2	7,5	Verde Amarillento	52,09	Resistente	Hospedante
GTP42P4F2	6,7	Verde Claro	50,3	Resistente	Hospedante deficiente
GTP42P5F2	3,1	Verde Oscuro	44,9	Resistente	Hospedante
GTP43P1F4	1,6	Verde Claro	52,76	Resistente	Hospedante deficiente
GTP43P4F4	2,92	Verde Oscuro	51,4	Resistente	Hospedante
GTP43P5F4	9,11	Verde Oscuro	57,46	Resistente	Hospedante deficiente
GTP45P2F6	4,7	Verde Oscuro	51,34	Resistente	No hospedante
GTP45P4F6	1,6	Verde Claro	55,8	Resistente	Hospedante deficiente
GTP5	1,5	Verde Claro	58,5	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP9	3,14	Verde Oscuro	59,51	Resistente	No hospedante

En el Grupo 2: **GTP 39** *Solanum quitoense* x *Solanum vestissimum* (semilla) y **GTP 46** con 9.8 y 5.29 kg/plt respectivamente.

Grupo 2					
Grupos Morfológicos	**Rend kg/plt**	**Color de la Pulpa**	**Diámetro del Fruto (mm)**	**Reacción de Incidencia *Fusarium* (Calificación)**	**Reacción de incremento de Nematodos (Calificación)**
GTP6	0,89	Verde Claro	50,21	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP7	7,8	Verde Oscuro	56,12	Susceptible Muy alta	Hospedante
GTP14	3,4	Verde Amarillento	55,64	Susceptible Media alta	Hospedante eficiente
GTP15	0,32	Verde Amarillento	46,76	Susceptible Muy alta	Hospedante muy eficiente
GTP18	11,2	Verde Amarillento	59,31	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP26	2,5	Verde Amarillento	54,32	Susceptible Alta	Hospedante
GTP33	5,75	Verde Claro	51,39	Resistente	Hospedante deficiente
GTP37	4,5	Verde Claro	58,46	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP39	9,8	Verde Oscuro	58,12	Resistente	No hospedante
GTP40P2F12	3,1	Verde Claro	53,34	Resistente	Hospedante deficiente
GTP40P4F12	4	Verde Claro	49,5	Resistente	No hospedante
GTP40P5F12	2,2	Verde Claro	56,87	Resistente	Hospedante
GTP41P1F1	1,98	Verde Claro	60,5	Resistente	Hospedante eficiente
GTP42P3F3	4,2	Verde Claro	49,65	Resistente	Hospedante
GTP43P2F4	20,5	Verde Oscuro	39,5	Resistente	Hospedante muy eficiente
GTP43P3F4	8,4	Verde Claro	48,25	Resistente	Hospedante
GTP45P1F6	0,9	Verde Amarillento	57,5	Susceptible Muy alta	No hospedante
GTP46P1F8	3,7	Verde Amarillento	49,63	Resistente	No hospedante
GTP46P2F8	5,23	Verde Amarillento	47,9	Resistente	No hospedante

Los trabajos realizados por el Programa de Fruticultura del INIAP en cuanto a realizar trabajos continuos a partir de esta tesis en El Triunfo – Provincia de Pastaza y el Chaco – Provincia de Napo, trabajan en investigaciones evaluando resistencia a plagas en las estas colecciones de cruzamientos ínter específicos de Naranjilla y especies afines y los cuales buscan entregar materiales resistentes o tolerantes a plagas, alta productividad y calidad del fruto, por lo que es importante continuar, profundizando el conocimiento en esta área de estudio hasta llegar a seleccionar y recomendar a los productores nuevos materiales mejorados de naranjilla para el mercado local y por qué no, para el internacional también.

Con estos materiales se ha empezado la propagación con la obtención de baretas para la reproducción asexual de la Naranjilla, en la injertación y finalmente en la obtención de plantas que son vendidas al público en general.

2.2.2.5. Conclusiones

Se logró establecer la variabilidad genética en la colección de naranjilla mediante la distancia de Gower y el análisis multivariado jerárquico de Ward (1963) formándose Tres conglomerados o Grupos de materiales además, doce morfotipos entre los cruzamientos dentro de la colección.

De los 21 descriptores cuantitativos evaluados, nueve caracteres resultaron ser discriminantes por su alta significancia según la prueba Ji ², para considerarse en evaluaciones futuras. Doce caracteres cualitativos fueron discriminantes ya que presentaron alta significancia según la prueba Ji², variables que deben ser consideradas para futuras investigaciones.

En cuanto a la resistencia, se ha observado que en los diferentes grupos existen mayor cantidad de segregantes con resistencia en plantas de semilla al contrario de las plantas que provienen de estaca, con este método de propagación se

puede ampliar el número de plantas con alta resistencia y así tener mayor cantidad de segregantes con características deseables de resistencia.
En cuanto al análisis de la calidad de los frutos, tenemos materiales con tamaños de fruta diferentes, variabilidad en sabores, aromas para todos los gustos, variabilidad que ayudó a seleccionar materiales que pueden tener potencial en el mercado o también pueden servir para transferir sus genes a materiales que carecen de ciertas características.

Con base al análisis de las diferentes variables como resistencia, calidad de fruta y rendimientos los mejores materiales dentro de los cruzamientos interespecíficos son: (GTP 30, GTP 36, GTP 42P3F2, GTP 43P5F4, GTP 39, GTP 46P2F8)

2.2.2.6. Recomendaciones

Para investigaciones de este tipo se debe tomar muy en cuenta las variables cuantitativas y cualitativas que resultaron tener un alto valor discriminante.

Una vez seleccionados los materiales, multiplicarlos para establecer huertos en diferentes localidades y con un mayor número de plantas para una selección participativa con productores de las zonas naranjilleras del país con la finalidad de determinar nuevos clones que podrían difundirse de manera comercial.

Con el Departamento de Biotecnología, hacer multiplicaciones clonales para una reproducción masiva de los materiales seleccionados (GTP 30, GTP 36, GTP 42P3F2, GTP 43P5F4, GTP 39, GTP 46P2F8, para ensayos en diferentes áreas donde se cultiva la naranjilla, para observar los comportamientos que podrían ser diferentes al lugar de origen de la evaluación.

Con las semillas de los frutos de los materiales seleccionados (GTP 30, GTP 36, GTP 42P3F2, GTP 43P5F4, GTP 39, GTP 46P2F8), continuar las evaluaciones con nuevos segregantes que podrían reunir características deseables de resistencia, altos rendimientos y calidad de la fruta.

Iniciar con base a la caracterización de los materiales, planes de hibridación para incorporar genes deseables a ciertos materiales que presentan buenas características pero que es necesario mejorarlos en algunos aspectos como mejorar el tamaño de la fruta, corregir el color de la pulpa, añadir aroma al jugo, resistente a la marchitez vascular y nematodos, etc.

2.2.2.7. Bibliografía

CHILUIZA, A. y HERRERA, J., 2008. Evaluación agronómica y resistencia a nematodos (*Meloidogyne incognita*) y al hongo (*Fusarium oxysporium*) de dos variedades de naranjilla injertas en siete accesiones de la sección Lasiocarpa en el noroccidente de Pichincha. Quito s/p.

CORPOICA. 2002. El cultivo del lulo. 1era. Edición. Editor, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Manizales. p. 83-91.

ECORAE-INIAP-OEA, 2001. Compendio de Recomendaciones Tecnológicas para los Principales Cultivos de la Amazonía Ecuatoriana. Quito, pp. 53-61.

REVELO, J; SANDOVAL, P., 2003. Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en la región amazónica del Ecuador; Quito-Ecuador. pp. 108.

SORIA, N., 1996. Progreso en el Mejoramiento Genético de Naranjilla en Ecuador; Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria Subregión Andina; Quito Ecuador; pp. 30-42.

2.2.3. Identificación molecular y caracterización genética y patológica de *Colletotrichum sp.* aislados de naranjilla *(Solanum quitoense lam),* tomate de árbol *(Solanum betaceum)* y chirimoya *(Annona cherimola mill)* provenientes de zonas productoras en ecuador[18].

Objetivo del proyecto (3): ***"****Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes"*

2.2.3.1. Objetivos

Objetivo General

Identificar molecularmente y caracterizar genética y patológicamente aislados de Colletotrichum sp. procedentes de naranjilla (*Solanum quitoense Lam*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y chirimoya (*Annona cherimola Mill*) provenientes de zonas productoras en Ecuador.

Objetivos Específicos

- Identificar las especies de *Colletotrichum* presentes en los tres cultivos mediante características morfológicas y técnicas de marcadores moleculares
- Determinar la variabilidad genética dentro de las especies identificadas de *Colletotrichum* y asociar con la epidemia de la enfermedad.

2.2.3.2. Marco Referencial

La antracnosis es una enfermedad que afecta a varios cultivos de importancia económica, es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum* (Bailey y Jeger, 1992; Pérez, 1993). La antracnosis puede ser considerada la enfermedad más cosmopolita del mundo, presentando una mayor severidad en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas son muy diversos y varían según el huésped e incluso de acuerdo al órgano o tejido afectado teniendo un efecto devastador a nivel de inflorescencias y frutos (Bailey y Jeger, 1992; Pérez, 1993). Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39

[18] Egdo. Diego Cárdenas, Ph. D. Eduardo Morillo, Ph. D. Wilson Vásquez, Ing. José Ochoa.

especies entre los que se encuentran especies tanto saprofíticas como parásitas (Sutton, 1992).

La identificación taxonómica clásica de especies dentro del género *Colletotrichum* está usualmente basada en más de una característica, como su apariencia física en el medio de cultivo, la morfología del patógeno y/o en la patogenicidad. (Freeman, 2000)

Muchas especies de *Colletotrichum* infectan simultáneamente al mismo hospedero (Freeman, 2000), y una misma especie más de un hospedero. Se ha reportado por ejemplo que *C. gloeosporioides, C. capsici*, y *C. coccodes* causan antracnosis en pimiento en Florida. (Roberts *et al*, 2001). Este tipo de identificación en especies de *Colletotrichum* es en la mayoría de casos subjetiva y se basa muchas veces en los criterios del autor. Esta subjetividad se debe principalmente a que en la clasificación se usan muchos criterios entre ellos morfológicos *in vitro* o de patogenicidad de hospederos, que son significativamente afectados por el ambiente, lo que dificulta su correcta identificación (Sutton, 1992; Cannon *et al*., 2000)

Las especies patogénicas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas entre las que se cuentan cereales, pastos, frutales, leguminosas y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. (Rodríguez, 2007). En cultivos como la chirimoya (*Annona cherimola Mill*) que por sus excelentes características organolépticas se considera la mejor fruta dentro de las anonáceas, (Nakasone y Paull, 1998) las enfermedades causadas por patógenos, particularmente por *Colletotrichum* spp pueden causar pérdidas importantes. En México se ha asociado a *C. gloeosporioides* con la antracnosis del fruto de chirimoya, con incidencia del 50 al 70%, reduciendo la calidad comercial del producto (Nava-Díaz *et al*., 2000). La naranjilla, cuyo origen está entre Ecuador y Colombia, donde es altamente cultivada (Heiser, 1985), también es afectada por la antracnosis, especialmente a los frutos, donde se manifiesta como una mancha negra que va aumentando hasta cubrirlos completamente. La antracnosis también afecta al tomate de árbol causando pérdidas de hasta un 90%, incrementando significativamente los costos de producción (Girard, 1977). En este cultivo los síntomas y los principales daños también se presentan en los frutos. Estas manchas reducen la calidad de presentación del fruto, por lo tanto su valor comercial en el mercado es inferior. Sin embargo, también se han observado ataques severos del hongo en ramas, las mismas que se secan. (Feicán *et al,* 1999)

Por la alta diversidad del género *Colletotrichum* la identificación de especies ha sido problemática, por lo que se requiere la identificación precisa y el comportamiento epidemiológico del patógeno para diseñar eficientemente medidas de control. En este caso las herramientas moleculares ayudan a superar dicha complicación taxonómica y permite caracterizar la diversidad interespecífica e intraespecífica de este grupo complejo de especies (Guerber et al, 2003). Los marcadores moleculares de ADN son muy estables y por lo tanto útiles en la

identificación de especies y poblaciones (Lewin, 2004). Los patrones obtenidos con marcadores como RAPDs y/o AFLPs pueden determinar la relación entre aislamientos al ser analizados con paquetes bioinformáticos que comparan los patrones y producen dendogramas indicando los grados de relación entre y dentro de poblaciones (Bridge et al, 1998). Esta metodología permite agrupar e identificar las diferentes especies de *Colletotrichum*, lo cual es de vital importancia para estudiar su etiología, epidemiología, y para establecer estrategias de control (Freeman *et al*., 1998; Adaskaveg y Föster, 2000.

Existen algunos estudios con marcadores moleculares reportados para el género *Colletotrichum.* Entre estos tenemos los realizados por Rodríguez (2007) quien corroboró la alta variabilidad fenotípica de especies de *Colletotrichum* asociados al cultivo de café en la región central cafetera de Colombia al determinar la variabilidad genética de las especies de *Colletotrichum* y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de cerezas del café, mediante la utilización de la técnica de PCR y la utilización de marcadores moleculares ITS. También Véliz (2005), realizó la caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* relacionados a plantaciones de lupino en Chile, este estudio tuvo como objetivo la determinación de la especie de *Colletotrichum* que se encuentra atacando a este cultivo y la variabilidad genética que presenta el hongo, en esta investigación el autor utilizó marcadores ITS-RFLPs y RAPDs, para la obtención de sus resultados. En frutales andinos, el estudio realizado por Marulanda, M., *et al* (2007) sobre la antracnosis, en cultivos de mora (*Rubus glaucus*) en Colombia, se hace uso de marcadores moleculares, en la determinación del agente causal de la antracnosis. El estudio realizado por Saldarriaga, A, *et al* (2008), mediante la utilización de marcadores moleculares ITS, se identificó a *Colletotrichum acutatum*, como el agente causal de la antracnosis en tomate de árbol.

2.2.3.3. Metodología

Colección de muestras de *Colletotrichum sp*: Se colectaron un total de 50 muestras de los tejidos enfermos de las plantas en estudio, 20 de cada cultivo en las principales zonas productoras del país, a excepción del cultivo de chirimoya que fueron 10 muestras, para un posterior aislamiento del patógeno. Para la colecta de muestras se tomaron en cuenta datos pasaporte. Se observaron las plantas que presentaron los síntomas de la enfermedad, en frutos se procedió a su recolección en bolsas plásticas, en caso de tallos, estos se envolvieron en papel húmedo y se transportaron en fundas plásticas al igual que hojas y peciolos.

Aislamiento del patógeno: El hongo se aisló de una mancha individual de fruto, hoja o tallo. Las muestras se lavaron con agua y jabón, eliminando desechos no deseados, se extrajeron pedazos de aproximadamente 0.2 cm^2 de tejido afectado por el patógeno, los mismos que se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, por dos minutos. Luego se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada (ADE), para luego depositar cinco pedazos en forma equidistante en las cajas petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), para incubar el patógeno a 25°C por 7 días y luego purificarlo. (Reyes, C., Morales, L., 2007)

Purificación del hongo: Se realizó un cultivo puro de *Colletotrichum sp*, que provino de un cultivo monospórico, del cual se realizaron subcultivos del micelio. En forma radial, con un sacabocados se tomaron discos de micelio de 6 mm de diámetro, los que se depositaron en el parte central de la caja petri conteniendo medio PDA.

Conservación del hongo: El hongo se conservó en papel filtro estéril, para esto en una caja petri con medio de cultivo PDA, se colocaron pedazos de 1 cm^2 de papel filtro estéril, para luego colocar sobre ellos un raspado del hongo, las cajas se llevaron a incubación por 10 días a 25°C. Luego se tomó cada uno de los papeles filtro con micelio del hongo y se los colocó en sobres estériles, los mismos que fueron almacenados a – 4°C (Aricapa, M., Correa, F. 1994).

Caracterización morfológica: Se incubó el patógeno a 25°C, en medio PDA (Papa Dextrosa Agar) para analizar las variables morfológicas en estudio: color de la colonia, presencia de microesclerocios y sectores, tipo de micelio, calidad de esporulación, velocidad de crecimiento.

Pruebas de patogenicidad: Las pruebas de patogenicidad se realizarán en plantas y frutos de tomate árbol y naranjilla, los datos obtenidos se extrapolarán a chirimoya.

Las pruebas se realizarán en plantas de tomate de árbol y naranjilla. El inóculo para las pruebas será obtenido de los aislamientos de *Colletotrichum* ya purificados y previamente seleccionados por el análisis molecular, selección basada en la variabilidad genética que presenten los aislamientos, y será preparado sumergiendo segmentos de medio de cultivo con micelio en agua estéril para posteriormente ajustar la concentración mediante una cámara de New Vahuer, a $1x10^5$ esporas/ml. (Viera, 2002).

Cuando las plantas lleguen a los 20 cm, se colocarán en un ambiente húmedo (cámara de humidificación) por dos horas, posteriormente se inocularán utilizando un microaspersor y una bomba de vacío a una dosis de 1ml por planta. Se realizarán humidificaciones diariamente por el lapso de 4 horas, hasta observar síntomas de la enfermedad.

En frutos de tomate de árbol y naranjilla, se realizarán pequeños orificios con una aguja estéril y se colocará sobre el orificio una gota (10 ul) del mismo inoculo preparado para las plantas. Los frutos serán colocados en cámaras húmedas y serán incubados a 25°C.

Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se multiplicará el hongo, de un cultivo monospórico se tomó con un sacabocados discos de 6mm de diámetro y se los depositó en 3 cajas Petri con PDA, se las incubó por 7 días a 25°C, después de los cuales se realizó un raspado de la superficie, extrayendo todo el micelio y las esporas, este material se colocó en tubos eppendorf. Los tubos fueron puestos

a -4°C durante toda la noche, para luego ser liofilizados durante 48 – 72 horas. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Colombo modificad por Piedra.

Identificación genética: Los aislados del hongo fueron identificados 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 primers ITS (White et al, 1990), ITS1 5´ TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3´, ITS4 5´ TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG 3´, los cuales fueron combinados de la siguiente manera: ITS1-ITS2, ITS1-ITS4.

Además, se utilizaron los primers específicos *Cg*Int 5´ GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG 3´ y *Ca*Int2 5´ GGGGAAGCCTCTCGCGG 3´, combinados con la secuencia-ITS 4 de la región conservada del gen 25/28S del ADNr (Afanador *et al* 2006; Brown *et al* 1996).

Se utilizó el protocolo de amplificación descrito por Álvarez *et al* (2005), para cada etapa de PCR se utilizó: Buffer Taq 10 X a una concentración final de 1 X (100mM de tris HCl, pH 8.2, 5mM $MgCl_2$ y 500mM KCl) 0.2 mM de cada uno de los dNTP´s, 0.5mM de cada primer, 1.5mM de $MgCl_2$ 2ng/ul de ADN, agua HPLC filtrada (0.22um) – autoclavada y 0.0375 U/ul de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación consistieron en 40 ciclos con una desnaturalización a 94º C por 30 s (120s para la inicial), 55º C por 30s de apareamiento y una extensión de 120s a 72º C (240s para la final), utilizando un termociclador (PTC – 100 MJ Research, Inc., Watertown, MA). Para detectar diferencias interespecíficas entre los aislamientos se utilizó el análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción combinado con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP) para lo cual se utilizó la enzima de restricción *Rsa* I siguiendo la metodología descrita por Álvarez et al (2005). La visualización de fragmentos se realizó en geles de agarosa 2% junto con un marcador de talla (100 bp) teñidos con bromuro de etidio 15 ppm.

Diversidad poblacional: Una vez identificados taxonómicamente los aislamientos la variabilidad intraespecífica se analizó por marcadores RAPDs, utilizando los RAPD-operon, OPAM 12, OPAM 14, OPS 08, OPS 09, OPS 12, OPS 15, OPS 16, OPS 18.

2.2.3.4. Resultados y discusión

Colección y aislamiento de muestras de *Colletotrichum sp.*: Se aislaron un total de 50 muestras, 20 muestras provenientes de plantas de naranjilla infectadas, 20 de tomate de árbol y 10 de chirimoya, de distintas provincias del Ecuador, como se detalla a continuación:

Aislamiento (Naranjilla)	Órgano Afectado	Provincia de Procedencia
C 1	HOJA	PICHINCHA
C 2	FRUTO	PICHINCHA
C 3	FRUTO	PICHINCHA
C 5	FLOR	PASTAZA
C 6	FRUTO	PASTAZA
C 8	HOJA	PASTAZA
C 9	FRUTO	PASTAZA
C 11	FLOR	PICHINCHA
C 13	HOJA	CARCHI
C 17	HOJA	PICHINCHA
C 19	FRUTO	PASTAZA
C 20	FRUTO	PASTAZA
C 21	FRUTO	PASTAZA
C 22	FLOR	CARCHI
C 23	FRUTO	CARCHI
C 25	HOJA	CARCHI

Aislamiento (T. árbol)	Órgano Afectado	Provincia de Procedencia
CA 1	FRUTO	PICHINCHA
CA 3	FRUTO	PICHINCHA
CA 4	FRUTO	PICHINCHA
CA 5	HOJA	PICHINCHA
CA 8	HOJA	TUNGURAHUA
CA 9	FRUTO	TUNGURAHUA
CA 10	FRUTO	TUNGURAHUA
CA 11	FRUTO	TUNGURAHUA
CA 13	HOJA	TUNGURAHUA
CA 17	HOJA	PICHINCHA
CA 19	FRUTO	AZUAY
CA 22	FRUTO	AZUAY
CA 23	FRUTO	LOJA
CA 24	FRUTO	AZUAY
CA 25	FRUTO	AZUAY
CA 26	FRUTO	AZUAY
CA 27	FRUTO	AZUAY
CA 28	FRUTO	AZUAY
CA 29	FRUTO	AZUAY

Aislamiento (Chirimoya)	Órgano Afectado	Provincia de Procedencia
CC 2	HOJA	PICHINCHA
CC 4	FRUTO	PICHINCHA
CC 7	TALLO	LOJA
CC 8	FRUTO	AZUAY
CC 9	HOJA	AZUAY
CC 10	FRUTO	AZUAY
CC 11	FRUTO	AZUAY
CC 12	FRUTO	AZUAY
CC 13	FRUTO	AZUAY
CC 14	FRUTO	IMBABURA

.

Caracterización morfológica: Morfológicamente, mediante las variables evaluadas se pudo ubicar a todas las muestras aisladas dentro del género *Colletotrichum*, sin embargo la asignación de la especie resulto complicada.

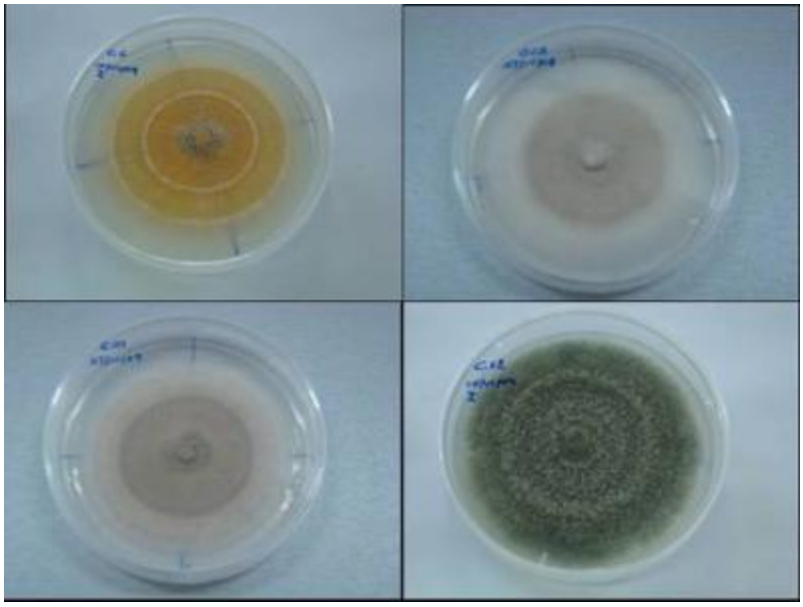


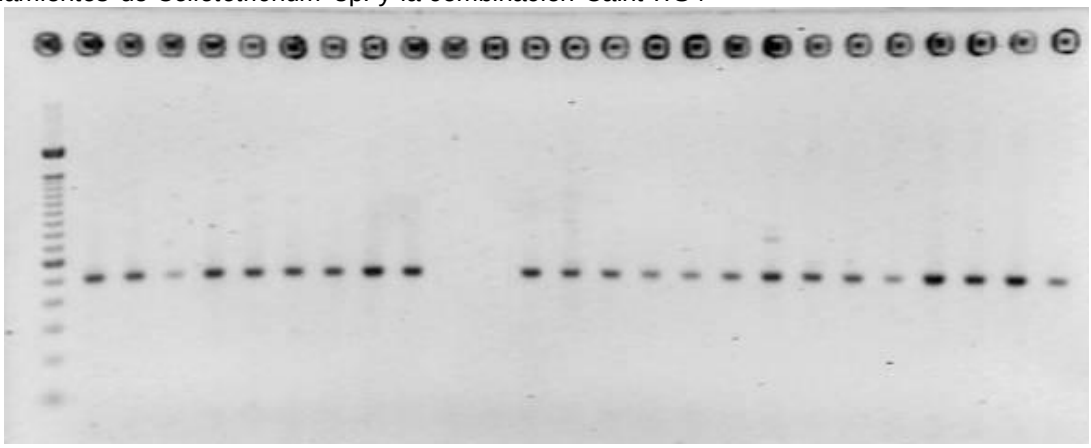
Figura 1. Muestra de las diferentes cepas de *Colletotrichum* sp. aisladas

Pruebas de patogenicidad: Hasta el momento se ha estandarizado el proceso de inoculación para el estudio de la patogenicidad, en espera del análisis de los datos obtenidos de la caracterización molecular, para proseguir con el ensayo, llegando a determinar que la concentración de esporas para la inoculación es de 1 x 105 esporas/ml, obteniendo de esta manera infección en plantas y frutos, en plantas sin herida y en frutos con una pequeña herida.

Extracción de ADN: Mediante la metodología utilizada se obtuvo una cantidad de ADN de 60 ng/ul en promedio, lo cual permitió realizar los ensayos posteriores sin ningún tipo de problema.

Identificación genética: Mediante la utilización de la combinación de los primers universales ITS1-ITS4 y la enzima de restricción Rsa I, se llegó a determinar la presencia de dos especies del género *Colletotrichum*, la especie *C. acutatum* y la especie *C. gloeosporioides*. Lo cual fue confirmado con la utilización de los primers especie-específicos, *Ca*Int y *Cg*Int.

Figura 2. Electroforesis Primers *Ca*Int-ITS4 1) Marcador 100bp, 2) al 26) ADN extraído de aislamientos de C*olletotrichum* sp. y la combinación CaInt-ITS4



Diversidad poblacional: Después de determinar las especies del género *Colletotrichum* presentes en las diferentes zonas productoras del Ecuador, se realizó un estudio con 8 primers RAPD-operon: OPAM 12, OPAM 14, OPS 08, OPS 09, OPS 12, OPS 15, OPS 16, OPS 18, obteniéndose una gran variabilidad intraespecífica.

-0.52

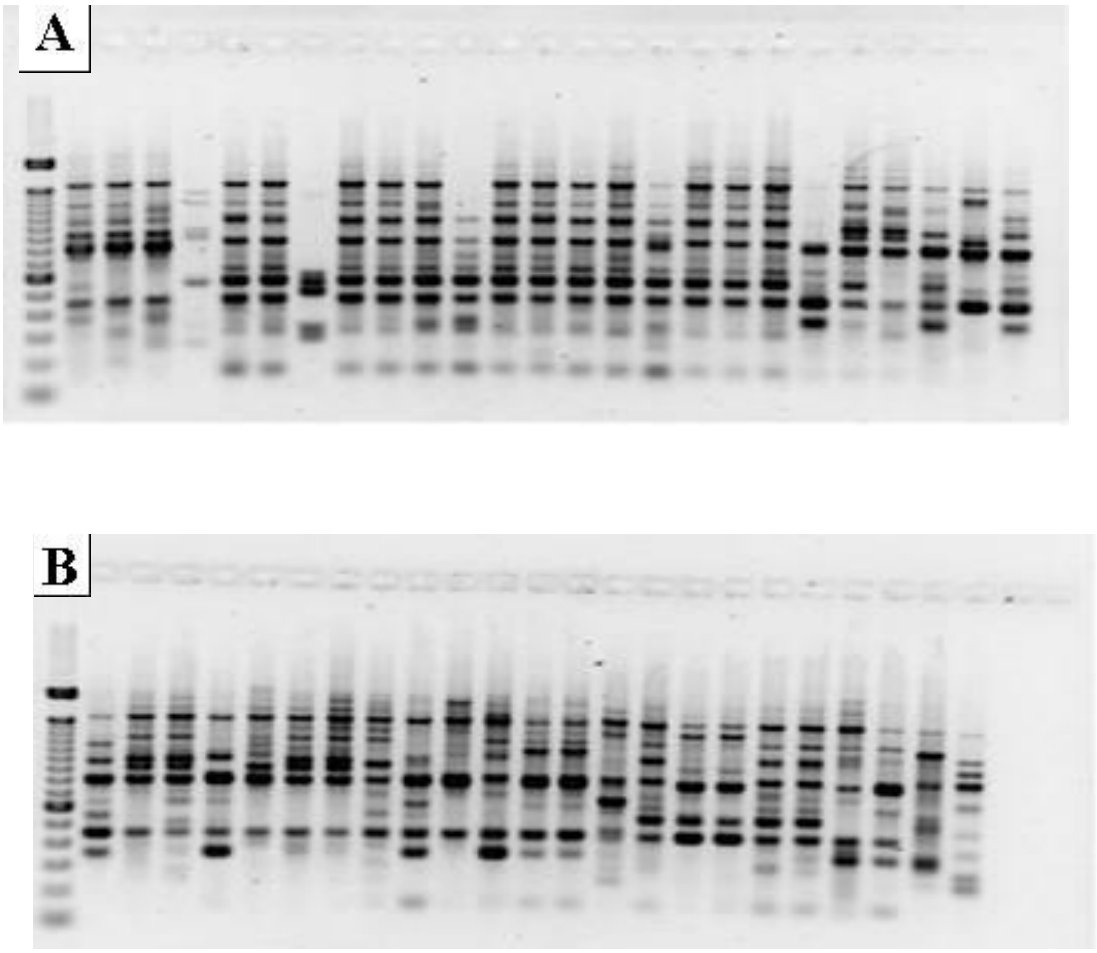


Figura 3. **A) Electroforesis RAPD-operon OPS15 1) marcador 100bp 2) al 20) ADN de Colletotrichum acutatum. T. árbol; 21) a 26) ADN de Colletotrichum acutatum. Naranjilla.** B) Electroforesis RAPD-operon OPS15 1) marcador 100bp 2) al 12) ADN de Colletotrichum acutatum. Naranjilla; 13) a 22) ADN de Colletotrichum acutatum. Chirimoya; 23 y 24) Control positivo, 25) Control negativo.

2.2.3.5. Conclusiones

- De los 50 aislamientos de *Colletotrichum sp.*, que formaron parte de este estudio, se determinó que 45 pertenecen a la especie *acutatum.*
- De los 5 aislamientos que no correspondieron a la especie *C. acutatum*, se pudo determinaran que pertenecen a la especie *C. gloeosporioides*, puesto que al realizar la digestión del producto de amplificación con los primers universales dio como resultado las bandas esperadas (reportadas), que a su

vez son iguales a las bandas obtenidas por la digestión del ADN del control positivo para la especie.

- De la caracterización morfológica se puede concluir que los aislamientos son muy difíciles de caracterizar con base a las variables planteadas, pues no es posible asignar con certeza la especie a la cual pertenece el aislamiento solo con este criterio.
- La especie del género *Colletotrichum sp.*, más difundida dentro de los cultivos de naranjilla en el Ecuador es la especie *acutatum.*
- La especie *gloeosporioides* dentro del estudio tiene una incidencia del 20% en los cultivos de naranjilla en las diferentes zonas del Ecuador.

2.2.3.6. Bibliografía

ADASKAVEG, J.; FÖSTER H. 2000. Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. *In*: *Colletotrichum*. host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. Prusky, D., S. Freeman, and M. Dickman (eds). American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp: 317-336.

AFANADOR, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia, and identification of a unique species from de genus. Phytopathology 93(5):579–587.

BAILEY, J.; JEGER M. 1992. *Colletotrichum* biology, pathology and control. London. England. Redwood Press. 388 p.

HEISER, C. 1985. Ethnobotany of the naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. Economic Botany 39:4-11.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. London, UK. Academic Press p. 315-322.

2.2.4. Manejo de la nutrición del cultivo de naranjilla *(Solanum quitoense lam.)* en las zonas de producción de la región amazónica y noroccidente de Pichincha [19].

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados".*

2.2.4.1. Objetivos

Objetivo General

Generar una recomendación de fertilización preliminar para el cultivo de Naranjilla (*Solanum quitoense Lam*.) en el primer año de cultivo.

[19] Resumen de tesis previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.
Félix Bastidas[19], Franklin Valverde[19], Pablo Viteri[3], Juan León[3]

Objetivos Específicos

- Determinar los nutrimentos limitantes del rendimiento para el cultivo de naranjilla en zonas de El Triunfo y El Chaco en la región Amazónica y Saloya en el noroccidente de Pichincha.
- Determinar niveles preliminares de contenido de nutrientes en el tejido vegetal para el diagnóstico del estado nutricional del cultivo de naranjilla.
- Documentar los síntomas visuales de deficiencias nutrimentales en el cultivo de naranjilla.
- Realizar análisis económico, aplicando la metodología de presupuesto parcial.

2.2.4.2. Marco Referencial

La naranjilla (*Solanum quitoense Lam)* es una fruta muy popular a nivel nacional e internacional por la exquisitez de su jugo, el fruto es de sabor agridulce, aromático y refrescante. Se lo utiliza en la elaboración de jugos, mermeladas, cocteles, jaleas, además de ser rica en vitamina A, C, B1, B2 y alta concentración de proteínas y minerales (CORPOICA, 2002).

El cultivo de naranjilla en décadas anteriores alcanzó un notable desarrollo, convirtiéndose en la base de la economía de algunos pueblos del oriente ecuatoriano; pero como se puede observar, en los últimos años hay una disminución de la productividad, siendo las principales causas: plagas, enfermedades, y sobretodo un manejo inadecuado de la nutrición del cultivo (Revelo y Sandoval, 2003). La naranjilla es un cultivo exigente en nutrimentos, progresa como cultivo pionero, utiliza la reserva mineral del suelo virgen, haciéndolo rentable, a tal punto de constituirse como principal agente de desbroce de la vegetación protectora y degeneración del ecosistema. Puesto que el bosque virgen almacena en el horizonte superficial orgánico la mayor parte de los nutrientes aprovechables, los mismos que desaparecen en el primer año del cultivo (Valarezo y Samaniego, 1982).

Según encuesta realizada por Revelo y Sandoval, (2003) mencionan que en la región amazónica, el 66 % de los agricultores no usan fertilizante, siendo este grupo el que practica el sistema de cultivo pionero, en el cual no se aplica fertilizantes ni materia orgánica porque los suelos que usan son nuevos, que provienen de bosque virgen o secundario. Según León (1986) citado por Revelo y Sandoval (2003) recomienda aplicar en el primer año 150g de Nitrógeno, 120g de Fosforo, 160g de Potasio, por planta/año de elemento puro o nutriente. Para el segundo año recomienda aplicar 120g de Nitrógeno, 160g de Fosforo, 130g de Potasio, por planta/año de elemento puro o nutriente.

En el Ecuador la mayoría de productores utilizan el cultivo de naranjilla como un cultivo de iniciación (antes de establecer otro cultivo o pastizales) ocasionando deforestación en bosques primarios, lo que significa una atractiva rentabilidad

inicial del cultivo. Al paso de los años por la extracción de nutrientes de estos suelos y la falta de incorporación de fertilizantes los rendimientos decrecen, los costos de producción se incrementan y por ende la rentabilidad del cultivo pierde su atractivo. Lo que conlleva a la utilización de nuevas áreas vírgenes con la consecuente destrucción de la selva primaria, cuya vegetación protectora no debería ser alterada.

El Manejo de nutrientes por sitio especifico, es una metodología que busca entregar nutrientes a la planta como y cuando los necesita. Esta forma de manejo permite ajustar dinámicamente el uso de fertilizantes para llenar afectivamente el déficit que ocurre entre la necesidad total de nutrientes para obtener rendimientos altos y el aporte de nutrientes provenientes del suelo, déficit que debe ser compensado con la aplicación de fertilizantes. Con esta forma de manejo se busca aplicar los nutrientes en dosis óptimas y en el momento adecuado para obtener altos rendimientos y alta eficiencia de uso de los nutrientes por el cultivo y de esta manera contribuir a la sostenibilidad del sistema de producción.

2.2.4.3. Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en dos localidades: en Saloya, Parroquia Saloya, Cantón Los Bancos, provincia de Pichincha, a una altitud de 1225 m, ubicada en el Km 89 en la vía Quito – Los Bancos. La localización geográfica es: Longitud 78º 50" 46.8" W y Latitud 0º 50" 46.8" S. La otra localidad está ubicada en El Triunfo, parroquia El Triunfo, cantón Pastaza, Provincia Pastaza, localizada en el Km 25 en la vía Puyo- Arajuno, a 1060 m de altitud. La localización geográfica es: Longitud 77º 47" 26.3" W y latitud 1º 25" 53.3" S. La precipitación anual en los Bancos es de 2000 - 3000 mm y en El Triunfo de 3500 – 4500 mm.

El suelo de Saloya está clasificado como un CRIANDEPS y el del Triunfo como un HIDRANDEPS; el régimen de humedad para las dos localidades es de húmedo a muy húmedo (Mejía, 1986). Los dos suelos presentan las siguientes características químicas: altos en nitrógeno, medios en fósforo y azufre y bajos en potasio, calcio y magnesio, el pH es ácido (menor a 4.8). El contenido de materia orgánica es alto; así en Saloya es de 26.6% y en El Triunfo 23.3%; textura: franco arenoso y franco, respectivamente.

Como material experimental se utilizó plantas de naranjilla variedad común "agria", injertas sobre patrón hirtum 119 (*Solanum hirtum*) resistente al ataque de nematodos (*Meloidogyne incognita)* y del hongo (*Fusarium oxisporum).*

El estudio se realizó en el primer año de cultivo, con la metodología de Manejo de nutrientes por sitio especifico, mediante la técnica de parcelas de omisión con diferentes tratamientos; los mismos incluyen parcelas de omisión, para determinar el suplemento de nutrientes nativos del suelo (N, P, K, Ca, S y Mg), una parcela donde tendrá una fertilización completa u óptima (+N, +P, +K, +Ca, +S, +Mg) y una parcela completa (+N, +P, +K, +Ca, +S, +Mg) más Cal agrícola ($CaCO_3$) como

encalado. En el (Cuadro 1), se describen las parcelas de omisión, completa y encalado.

Cuadro 1. Tratamientos y dosis de nutrientes para naranjilla en las provincias de pichincha y pastaza 2008.

Tratamientos		Cantidad de nutrientes (Kg/ha/año)					
Nº	Nutrientes	N	P_2O_5	K_2O	Ca	S	Mg
1	-N	0	150	200	100	30	60
2	-P	150	0	200	100	30	60
3	-K	150	150	0	100	30	60
4	-Ca	150	150	200	0	30	60
5	-S	150	150	200	100	0	60
6	-Mg	150	150	200	100	30	0
7	Completo	150	150	200	100	30	60
8	Completo + cal*	150	150	200	100	30	60

* + 3 TM/ha/año de Cal agrícola ($CaCO_3$)

Los fertilizantes utilizados fueron: Urea, Nitrato de calcio, Súperfosfato triple, Fosfato diamónico, Muriato de potasio, Sulpomag, Oxido de magnesio, Azufre de mina, Cal Agrícola. En cada localidad se utilizó el Diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La distancia de plantación fue de 2 m x 2 m y la parcela neta constó de 6 plantas. Las variables en estudio fueron: Altura de planta, análisis foliar, días a la cosecha, rendimiento y extracción de nutrientes por la cosecha.

2.2.4.4. Resultados y discusión

Rendimiento

El análisis de variancia para rendimiento de naranjilla, Cuadro 2, indica diferencias significativas al 1% para tratamientos en las dos localidades en estudio.

Cuadro 2. Análisis de varianza para rendimiento total de naranjilla en las localidades de saloya y el triunfo, 2008.

Fuentes de variación	G. de L.	Cuadrados Medios por localidades	
		Saloya	El Triunfo
Total	31		
Repeticiones	3	0,65 ns	0,89 ns
Tratamientos	7	1057,7 **	882,93 **
Error Experimental	21	0,21	0,46
C. V. (%)		1,07	1,91

NS = No significativo * = Significativo al 5% ** = Significativo al 1%

En el Cuadro 3, se observa que la prueba de Tukey al 5% para rendimiento de naranjilla, presenta seis rangos bien definidos, los mismos que coinciden en las dos localidades. Estos resultados demuestran que la respuesta del cultivo de naranjilla en Saloya y El Triunfo, estadísticamente tienen el mismo comportamiento; por tanto, la discusión de los resultados es igual para las dos localidades.

Cuadro 3. Rendimientos promedios de naranjilla y prueba de tukey para tratamientos en las localidades saloya y el triunfo, 2008.

	Tratamientos	Rendimiento/Localidades (t/ha)			
No.	**Nutrientes**	Saloya		El Triunfo	
1	-N	10.7	e	9.1	e
2	-P	7.5	f	5.1	f
3	-K	16.0	d	12.5	d
4	-Ca	21.3	c	17.4	c
5	-S	24.2	b	20.8	b
6	-Mg	15.7	d	12.4	d
7	Completo	21.6	c	17.8	c
8	Completo + cal*	27.4	a	23.7	a

El rendimiento máximo en las dos localidades (Cuadro 3), se obtuvo con la aplicación de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre y más cal (T8) y según la Prueba de Tukey se ubican en el primer rango (a), al comparar con el tratamiento completo (T7) y el T8 son estadísticamente diferentes, observándose el efecto positivo del encalado sobre el rendimiento de naranjilla. Al adicionar cal agrícola incrementamos el pH de los suelos y reducimos la toxicidad del aluminio (Al^{3+}), permitiendo una mejor absorción de nutrimentos por parte del cultivo de naranjilla, dando como resultado plantas vigorosas, con buen crecimiento y excelentes rendimientos, llegando a producir el T8 como mejor tratamiento 27,4 Tm/ha y el T2 como peor tratamiento 7,5 Tm/ha en la localidad de Saloya, con una reducción en el rendimiento del 72,5 % al no adicionar fósforo ni cal agrícola como encalado; en la localidad de El Triunfo el mejor tratamiento T8 alcanzo rendimientos de 23,7 Tm/ha y el peor tratamiento T2 alcanzo rendimientos de 5,08 Tm/ha, dando así un detrimento en el rendimiento del 78,56 % por falta de P y cal.

En un segundo rango se ubicó el tratamiento sin azufre (T5), superando al tratamiento completo (T7), los resultados obtenidos en las dos localidades (Cuadro 3 y Figura 1) demuestran un efecto depresivo del azufre, sobre el rendimiento de fruta de naranjilla; por lo tanto, no es necesario fertilizar con azufre en naranjilla, aún en suelos que presenten contenidos bajos de este elemento.

En el mismo cuadro 3, se observa en el tercer rango el tratamiento completo con aplicaciones de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio azufre y magnesio (T7), siendo superado por el tratamiento sin azufre (T5) y el completo + cal (T8). Al comparar el tratamiento completo (T7) frente a la omisión de los nutrimentos en estudio, se observa que el principal nutrimento que está limitando la producción de naranjilla en las dos localidades es el fósforo (T2), ubicándose en el último rango (f) con los menores rendimientos de naranjilla (Cuadro 3 y Figura 1). Según los resultados del análisis de suelo de las dos localidades, el contenido de fósforo es medio; sin embargo, la respuesta del cultivo de naranjilla a la aplicación de fósforo es alta, demostrando que el requerimiento de este nutrimento por el cultivo es alto. El Fósforo como el nitrógeno son importantes como parte estructural de muchos compuestos, principalmente ácidos nucleicos y fosfolípidos, además el fósforo desempeña una función indispensable en el metabolismo energético (Bidwell, 1993).

El segundo nutrimento que limita la producción de naranjilla es el nitrógeno, ubicándose el tratamiento –N (T1) en el quinto rango (e), el contenido inicial de nitrógeno y matera orgánica en los dos suelos es alto; sin embargo, debido a las precipitaciones continuas en las zonas de producción de naranjilla, el nitrógeno se pierde rápidamente por lixiviación, siendo necesario aplicaciones periódicas de este elemento, para evitar la aparición de síntomas visuales de deficiencia. El Nitrógeno tiene un lugar especial en la nutrición no solo debido a su elevado requerimiento por las plantas sino porque está casi completamente ausente de la roca madre de la cual se forman los suelos, ya que la presencia de nitrógeno es totalmente el resultado de la acción biológica, abono artificial o fertilizante natural (resultado de las descargas eléctricas atmosféricas) (Bidwell, 1993).

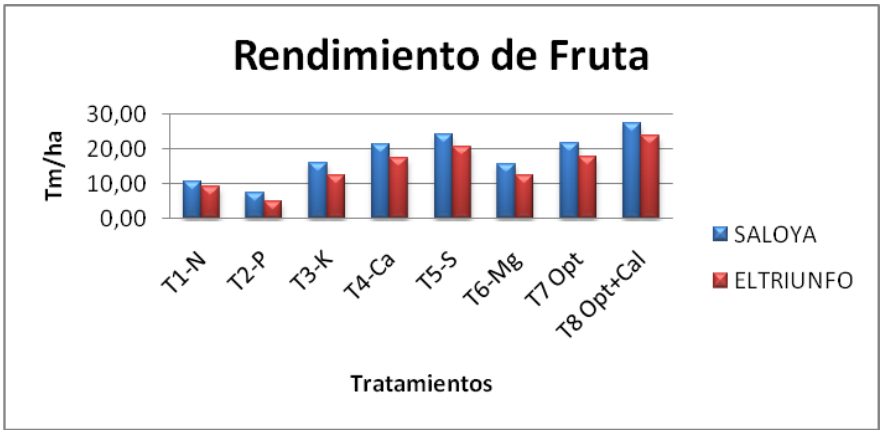


Figura 1. Efecto de la omisión de nutrientes en el rendimiento de naranjilla al primer año de evaluación en saloya y el triunfo, 2008.

A continuación se encuentran en el cuarto rango (d) el potasio y magnesio como nutrimentos que limitan la producción de naranjilla (Cuadro 3 y Figura 1); el contenido inicial en el suelo es bajo y la aplicación de estos nutrimentos contribuyen en la actividad enzimática, el crecimiento de raíces y parte aérea de la planta, resistencia a enfermedades, incrementan el rendimiento y mejoran la calidad de la fruta. El calcio no influyó en el rendimiento de naranjilla en ninguna de las localidades y el tratamiento sin calcio (T4) se ubica en el mismo rango (c) del tratamiento completo (T7)

Estos resultados demuestran que el elemento limitante de la producción es el fósforo, luego el nitrógeno, finalmente el magnesio y potasio; los demás elementos no influyen significativamente en el rendimiento de naranjilla. Como enmienda para corregir la acidez intercambiable de suelos con pH ácido es necesario aplicar cal agrícola o cal dolomita.

Distribución de los nutrientes en las plantas de naranjilla

En la fruta se acumula el 61% del fósforo, 60% de potasio, el 42% de nitrógeno, el 41% de azufre, el 25% de magnesio y el 16% de calcio, del total de nutrimentos absorbidos por la planta de naranjilla; la diferencia se distribuye en las hojas, tallos

y raíces, regresando gran parte de estos nutrimentos al suelo, mediante las podas de las plantas.

Síntomas visuales de deficiencias para macro nutrientes

Los síntomas de deficiencias de los diferentes nutrimentos (N, P, K, Ca, Mg) que se apreciaron durante las fases fenológicas del cultivo de naranjilla durante el primer año en las dos localidades se describen a continuación:

La deficiencia de Nitrógeno (N), se mostró con una clorosis de las hojas maduras (bajeras), tornándose amarillentas para luego desprenderse. La clorosis se extendió de hojas maduras a hojas jóvenes, pero en menor intensidad, lo que indica la translocación del nitrógeno desde las hojas maduras a los puntos de crecimiento donde existe mayor demanda de este nutrimento. Otro síntoma fue un pobre crecimiento de la planta, con hojas pequeñas y una escasa ramificación.

La deficiencia de Fósforo (P), se presentó con plantas achaparradas, un color verde intenso con cierto brillo en hojas jóvenes, las nervaduras se tornaron de coloración púrpura más de lo normal, hojas abarquilladas hacia el haz y una pobre floración. Además una leve clorosis en hojas maduras lo que indica la alta movilidad del nutrimento en la planta y la translocación hacia las zonas de mayor demanda.

La deficiencia de Potasio (K), se manifestó con una particular clorosis moteada y necrosis paralela a las nervaduras en hojas maduras, lo que confirma además la movilidad de este nutrimento.

La deficiencia de Calcio (Ca), se mostró con una clorosis de los márgenes de hojas jóvenes, lo cual indica la inmovilidad de este nutrimento, además de ser un elemento que raramente muestra su deficiencia en condiciones naturales.

La deficiencia de Azufre (S) en el cultivo de naranjilla cuando se omitió este nutrimento, fue una clorosis en los puntos de crecimiento, contrariamente a lo que ocurre con el nitrógeno, siendo el azufre un nutrimento inmóvil dentro de la planta.

La deficiencia de Magnesio (Mg), es muy común en suelos ácidos, en nuestro caso se presentó con síntomas característicos como clorosis entre las nervaduras (clorosis intervenal) acompañada de algunos pigmentos anaranjados; puesto que el magnesio es muy soluble y de rápido transporte por toda la planta, los síntomas de su deficiencia generalmente aparecen primero en las hojas maduras.

Análisis Económico

Con este análisis, el cual toma únicamente los costos que varían en cada tratamiento, los cuales en esta investigación fueron: los insumos de campo y la mano de obra utilizados en este cultivo en función de rendimiento, se determinó

que el tratamiento con el beneficio neto más elevado en las dos localidades fue el T8 : Opt + Encalado, con un beneficio neto de $ 16412,6 en la (L1-Saloya) y $ 13786,4 en la (L2-El Triunfo); el tratamiento con el beneficio neto más bajo en las dos localidades fue el T2: NKCaSMg, con un beneficio neto de $4053,6 en la (L1) y $ 2295,1 en la (L2), todo esto proyectado por hectárea; esta diferencia entre localidades se debe a que el rendimiento total en la (L1) fue 14 % más que en la (L2).

2.2.4.5. Conclusiones

Una vez realizados los análisis estadísticos se llegó a las siguientes conclusiones:

- Los nutrimentos limitantes en el desarrollo y producción del cultivo de naranjilla en la zonas en estudio en orden de importancia son: el Fósforo, Nitrógeno, Magnesio y Potasio, el Calcio no presento ningún efecto en el rendimiento, el azufre tendió a disminuir significativamente el rendimiento.
- Los rendimientos obtenidos en la localidad de El Triunfo-Pastaza, fueron ligeramente inferiores al rendimiento de Saloya-Pichincha, lo cual se atribuye al efecto de altas precipitaciones que promueven la perdida de nutrientes en el suelo y por ende un menor aprovechamiento por parte del cultivo de naranjilla.
- El cultivo de naranjilla responde positivamente a la fertilización química, este efecto se ve reflejado en la sintomatología de deficiencias que presentaron los tratamientos de omisión y en los análisis foliares.
- Los rendimientos se incrementaron con una fertilización completa frente a los tratamientos de omisión, a excepción del tratamiento de omisión de azufre (T5), cuyo rendimiento supero al tratamiento con fertilización completa (T7); en el tratamiento de fertilización completa más cal agrícola (T8), los rendimientos superaron a todos los tratamientos; por lo tanto la aplicación de cal agrícola en las zonas de estudio influyo notablemente en el rendimiento.
- Con esta investigación se determinó el aporte de nutrientes por fuentes nativas del suelo para el cultivo de naranjilla en las zonas en estudio; también se determinó en el tratamiento de omisión de azufre (T5) que el aporte por fuentes nativas de este nutriente en el cultivo de naranjilla es suficiente para obtener altos rendimientos.
- Al realizar los análisis de suelo al final del primer año se determinó que la aplicación de fertilizantes químicos incrementó el contenido nutricional en cada tratamiento, a excepción de los elementos omitidos se puede ver que existió un desgaste ya que hubo un aporte y una buena extracción por el cultivo de naranjilla.
-

2.2.4.6. Recomendaciones

En las zonas de producción de naranjilla fertilizar con Nitrógeno, fósforo y potasio; para corregir la acidez intercambiable del suelo aplicar cal dolomita como enmienda y fuente de magnesio.

Continuar con el trabajo de investigación sobre manejo de nutrientes por sitio específico en el cultivo de naranjilla durante el segundo año para obtener más información acerca de la demanda real de nutrientes por parte del cultivo durante su ciclo de producción y así determinar dosis de fertilización.

Realizar trabajos de investigación sobre niveles de encalado en las zonas de producción de naranjilla en la región Amazónica y noroccidente de Pichincha.

La recomendación de fertilización para el primer año del cultivo de naranjilla, en suelos con características similares es de 150 – 150 – 200 – 60 kg/ha/año de N - P_2O_5 - K_2O – y Mg, respectivamente.

2.2.4.7. Bibliografia

ALZATE, B. 1982. El cultivo del lulo (Solanum quitoense. Lam) en Colombia. En Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. Pp.48. Quito- Ecuador.

BIDWELL, R. 1993. El Suelo y la Nutrición Mineral. pp. 267-292. México, D. F.

CAÑADAS, L. 1993. El mapa Bioclimático y ecológico del Ecuador. pp. 34-55 MAG-PRONAREG. Quito-Ecuador.

CORPOICA. 2002. El cultivo del lulo. 1era. Edición. Editor, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. pp. 83-91. Manizales – Colombia.

CONNOR, O; et al. 1993. Química del Suelo. pp. 233-255. México, D.F.

2.2.5. Evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *Neoleucinodes elegantalis* (G.). Tumbaco – Pichincha[20].

Objetivo del Proyecto (3): "*Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.2.5.1. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar el efecto de once sustratos en el desarrollo de larvas de *Neoleucinodes elegantalis* (G.) en condiciones de laboratorio.

Objetivo específico

- Seleccionar el sustrato adecuado para el desarrollo de larvas de *N. elegantalis.*

[20] Evelyn Viteri, Dr. Wilson Vásquez, Ing. Pablo Viteri Técnicos Programa Nacional de Fruticultura, Dr. Saulo de Jesús Soria

2.2.5.2. Marco Referencial

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) es un fruto de amplia aceptación en el mercado nacional e internacional, por su aroma, sabor, valor nutritivo, la calidad de su jugo y uso en la agroindustria (Angulo, 2006).

Entre las principales plagas del cultivo se encuentra el "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*), que es de gran importancia porque causa pérdidas de hasta el 80 % de la producción (Gallegos et al, 2006). Su control se ha limitado en gran medida a la aplicación de plaguicidas como carbofurán, metamidofos y monocrotofos, mismos que son utilizados en altas dosis lo que puede afectar la salud humana y el medio ambiente (Revelo y Sandoval, 2003).

Con el objetivo de integrar el control biológico a las medidas de control de *N. elegantalis*, Sosa (2009) identificó enemigos naturales, entre los cuales se registraron: *Beauveria sp.*, *Aspergillus sp*., *Paecilomyces sp¸*, *Bacillus cereus*, *Paenibacillus polymyxa*, los virus NeelV1 y NeelV2, los parasitoides: *Copidosoma sp.* (Encyrtidae: Encyrtinae), *Meteorus* sp. (Braconidae: Meteorinae), y *Lymeon* sp. (Ichneumonidae: Cryptinae).

El establecimiento de la cría de *N. elegantalis* en laboratorio es necesario para la ejecución de pruebas de patogenicidad, determinación de virulencia, y agresividad de los entomopatógenos identificados, así también para la posterior propagación de enemigos naturales y su liberación en campo, como parte de las estrategias de manejo integrado de la plaga.

2.2.5.3. Metodología

El ensayo tuvo lugar en las instalaciones del laboratorio del Programa de Fruticultura del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias a 2348 m.s.n.m. Las condiciones ambientales de la sala de cría de *N. elegantalis* fueron controladas y mantenidas a 20 ± 2°C y 80 ± 10 % HR con la ayuda de cuatro humidificadores y un calefactor.

Los tratamientos evaluados fueron: **(S_1)** germen de trigo, levadura de cerveza, fréjol, naranjilla, ácido ascórbico, agar, agua y antimicrobiales; **(S_2)**: germen de trigo, levadura de cerveza, fréjol, naranjilla, ácido ascórbico, agar, agua, antimicrobiables e infusión de flores de naranjilla; **(S_3)**: levadura de cerveza, naranjilla, ácido ascórbico, agar, agua y antimicrobiales; **(S_4)**: levadura de cerveza, naranjilla, ácido ascórbico, agar, agua, antimicrobiales e infusión de flores; **(S_5)**: levadura de cerveza, berenjena, ácido ascórbico, agar, agua y antimicrobiales; **(S_6)**: levadura de cerveza, berenjena, ácido ascórbico, agar, agua, antimicrobiales e infusión de flores; **(S_7)**: germen de trigo, levadura de cerveza, naranjilla, zanahoria, caseína, agar, agua y antimicrobiales; **(S_8)**: germen de trigo, levadura de cerveza, naranjilla, zanahoria, caseína, agar, agua, antimicrobiales e infusión de flores de naranjilla; **(S_9)**: germen de trigo, levadura de cerveza, berenjena, zanahoria, caseína, agar, agua, antimicrobiales; **(S_{10})**: germen de trigo, levadura

de cerveza, berenjena, zanahoria, caseína, agar, agua, antimicrobiales e infusión de flores; **(s_{11})** fruto de berenjena (*Solanum melongena*).

Se utilizó un Diseño Completo al Azar con once tratamientos, distribuidos en seis observaciones. La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 8 cm de altura, con 20 g de sustrato. Debido a sus características de agresividad, se efectuó el repique de las larvas transcurridos quince días de desarrollo, las cuales fueron confinadas en cinco recipientes plásticos de 10 cm de diámetro y 5 cm de altura, con ventilación en la cubierta, conteniendo 3 g de sustrato, a razón de dos individuos por recipiente. El tratamiento con berenjena, consistió en un fruto de aproximadamente 200 g, sobre el cual se colocaron diez larvas de primer instar de *N. elegantalis*; el fruto se confinó en un recipiente plástico de dimensiones: 20 cm de largo, 20 cm de ancho y 12 cm de alto.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de larvas recuperadas, peso de pupas macho y hembra, porcentaje de emergencia de adultos macho y hembra, días a la emergencia de adultos macho y hembra.

2.2.5.4. Resultados y discusión

Porcentaje de larvas recuperadas

En el análisis de variancia, Cuadro 1, se detectó alta significancia estadística para sustratos. El promedio general fue de 13.06 % de larvas recuperadas. El CV fue de 9.78 %, un valor excelente que valida los resultados. Tukey al 5 %, Cuadro 2, detectó cuatro rangos de significación, encabezado por el sustrato s_{11} con el 81.67 % de larvas recuperadas, mientras que el último rango comprendieron los sustratos s_2, s_3, s_4, s_5 y s_6, en los cuales no hubo sobrevivencia.

Cuadro 1. Adeva de porcentaje de larvas recuperadas en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *neoleucinodes elegantalis*. Tumbaco, pichincha. 2010.

Fuentes de Variación	GL	CM
Total	61	
Sustratos	10	3383.44**
EExp.	51	1.63
Promedio:	**13.06 %**	
CV:	**9.78 %**	

Cuadro 2. Tukey al 5 % para el porcentaje de larvas recuperadas en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *neoleucinodes elegantalis*. Tumbaco, pichincha. 2010.

Sustrato	Porcentaje de larvas recuperadas	Rangos de Significación
s_{11}	81.67	a
s_7	20.00	b
s_1	10.00	c
s_8	10.00	c
s_9	10.00	c
s_{10}	10.00	c
s_2	0	d
s_3	0	d
s_4	0	d
s_5	0	d
s_6	0	d

Beck y Chippendale (1968), manifiestan que el sustrato debe proveer de incitantes físicos y químicos que promuevan la alimentación y, de estimulantes de la ingestión de cantidades suficientes de alimento por el insecto, que satisfagan sus necesidades metabólicas, similar a la especificidad del hospedero natural.

Por tanto los resultados son analizados en este orden: presencia de incitantes físicos, químicos y, presencia de estimulantes de alimentación de larvas de *N. elegantalis* en los sustratos. La alimentación de larvas confinadas en los sustratos s_3, s_4, s_5 y s_6 fue limitada, entre otras características, por el bajo contenido de agua (60.58%), mientras que el porcentaje de agua fue mayor en los sustratos s_1 (76.94%), s_7, s_8, s_9 y s_{10} (80.45%), por lo que adquirieron una consistencia blanda, lo que posibilitó la formación de galerías, como sucede en hospederos naturales. El contenido de agua en los sustratos determinó su consistencia y por tanto su aceptación por larvas de *N. elegantalis*, es decir respondieron al incitante de naturaleza física. El contenido satisfactorio de agua en los sustratos de desarrollo concuerda con lo manifestado por Beck y Chippendale (1968), entre el 65 y 85%.

Beck y Chippendale (1968) manifiestan que especies con gran especificidad requieren de la presencia de incitantes químicos de la planta hospedera incorporados en el sustrato para dar inicio a su alimentación.

El porcentaje de larvas recuperadas en el sustrato s_{11} fue mayor al resto de sustratos porque berenjena es su hospedero natural y las condiciones ambientales se mantuvieron constantes.

La naranjilla incorporada en los sustratos s_1, s_2, s_3, s_4, s_7 y s_8 pudo haber actuado como incitante de la alimentación de larvas, así como berenjena en los sustratos s_5, s_6, s_9 y s_{10}, lo que sugiere que *N. elegantalis* requiere de incitantes químicos de la planta hospedera en el sustrato para dar inicio a su alimentación, así como de incitantes físicos.

Sin embargo, la infusión de flores de naranjilla incorporada en los sustratos s_2, s_4, y s_6 cesó la alimentación de larvas en relación a s_1, s_3, y s_5, respectivamente. Mientras que en los sustratos s_8 y s_{10} no ejerció ningún efecto. Este fenómeno sugiere que los volátiles de flores de naranjilla pudieron necesitar de procesos diferentes de extracción como destilación ó enfleurage, que permitan el mejor aprovechamiento de los aceites esenciales y su efecto incitante sobre *N. elegantalis*.

La alimentación de larvas en los sustratos s_3, s_4, s_5, s_6 fue incitada por la presencia de su hospedero natural incorporado en el sustrato, sin embargo, la carencia de germen de trigo resultó en la mortalidad total de las larvas en estado inmaduro, no así en los sustratos s_1, s_7, s_8, s_9, y s_{10}, conformados por germen de trigo. Larvas de *N. elegantalis* pudieron haber sintetizado ácidos grasos a partir de proteínas y carbohidratos (Parra, 1991), sin embargo los sustratos s_3, s_4, s_5, s_6 también carecieron de fuentes importantes de carbohidratos y proteína: germen de trigo y fréjol, respectivamente. La levadura de cerveza como único aporte de energía y proteína no logró satisfacer las necesidades nutritivas de las larvas.

Peso de pupas macho

En el análisis de variancia se detectó alta significación estadística para sustratos. El promedio general fue de 30.17 mg/pupa. El CV fue de 5.18 %, un valor excelente. Tukey al 5 %, Cuadro 3, detectó cuatro rangos de significación, encabezado por el sustrato s_{11} con un peso de 40.63 mg, y el último rango comprendieron los sustratos s_9 y s_{10} con 20.0 y 18.0 mg, respectivamente.

Pupas macho provenientes de s_{11} alcanzaron el mayor peso, el fruto de berenjena por ser hospedero natural de *N. elegantalis,* proporcionó los incitantes y nutrientes necesarios para el óptimo desarrollo larval.

El mayor peso pupal alcanzado en sustratos elaborados fue de 35.50 mg, correspondiente a s_1, las pupas se mostraron vigorosas y sanas, sin deformaciones similares a s_{11}. Lo cual sugiere que los nutrientes contenidos en s_1 actuaron como estimulantes de la ingestión activa por larvas de *N. elegantalis* en relación al resto de sustratos elaborados. El sustrato s_1 se caracterizó por tener alto contenido proteico provisto por el germen de trigo, levadura de cerveza y fréjol, en conjunto, los cuales aportaron en los procesos metabólicos de larvas y pupas (Parra, 1991).

Cuadro 3. Tukey al 5 % para peso de pupas macho en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *n. Elegantalis* (g.). Tumbaco-pichincha. 2010.

Sustratos	Peso (mg)	Rangos de significación
s_{11}	40.63	a
s_1	35.50	b
s_7	27.83	c
s_8	26.50	c
s_9	20.00	d
s_{10}	18.00	d

Pupas provenientes de los sustratos s_7, s_8, s_9 y s_{10}, que carecieron completamente de ácido ascórbico, mostraron deformidad y mal desarrollo, mientras que el proceso de metamorfosis en s_1 fue completo y las pupas se mostraron sanas, lo cual sugiere que el ácido ascórbico interviene en procesos de metamorfosis de *N. elegantalis*.

Peso de pupas hembra

En el análisis de variancia se detectó alta significancia estadística para sustratos. El promedio general fue de 32.47 mg/pupa. El CV fue de 3.82 %, un valor excelente para este tipo de ensayos.

Tukey al 5 %, Cuadro 4, detectó cinco rangos de significación, encabezado por el sustrato s_{11} con 43.57 mg y en último rango los sustratos s_9 y s_{10} con un peso de 21.00 y 19.00 mg, respectivamente. El mayor peso alcanzado se registró en pupas procedentes de berenjena, s_{11}, por ser su hospedero natural.

El mayor peso entre los sustratos elaborados se obtuvo en s_1, por contener el aporte proteico del grano de fréjol a diferencia del resto de sustratos, lo que permitió el cumplimiento de procesos metabólicos de larvas y pupas como lo señaló Parra (1991). Pupas procedentes de s_7, s_8, s_9, y s_{10} que carecieron de ácido ascórbico, mostraron deformidad y mal desarrollo, mientras que pupas procedentes de s_1 se observaron sanas y sin deformaciones.

Cuadro 4**.** Tukey al 5 % para peso de pupas hembra en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *n. Elegantalis* (g.). Tumbaco-pichincha. 2010.

Sustratos	Peso (mg)	Rango de significación
s_{11}	43.57	a
s_1	36.75	b
s_7	28.00	c
s_8	24.50	d
s_9	21.00	e
s_{10}	19.00	e

Porcentaje de emergencia de adultos macho

En el análisis de variancia se detectó alta significancia estadística para sustratos. El promedio general fue de 61.59 % de emergencia. El CV fue de 10.64 %, valor excelente. Tukey al 5 %, Cuadro 5, detecta dos rangos de significación, encabezados por los sustratos s_1, s_7 y s_{11}, con un porcentaje de emergencia del 100.0, 100.0 y 92.50%. Las condiciones de temperatura y humedad mantenidas en la sala de cría aceleraron la descomposición de los frutos de berenjena, s_{11}, lo cual provocó la contaminación del 7.5 % de prepupas, mientras que prepupas procedentes de sustratos elaborados no fueron expuestas a tal condición por desarrollarse en sustratos esterilizados y con presencia de elementos antimicrobiales, con lo cual se genera material biológico óptimo para la realización de ensayos de carácter microbiológico y entomológico.

Cuadro 5. Tukey al 5 % para porcentaje de emergencia de adultos macho en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *n. Elegantalis* (g.). Tumbaco-pichincha. 2010.

Sustratos	% Emergencia	Rangos de significación
s_1	100.00	a
s_7	100.00	a
s_{11}	92.50	a
s_8	0.0	b
s_9	0.0	b
s_{10}	0.0	b

La carencia de ácido ascórbico en el sustrato s_7 resultó en la totalidad de adultos con alas y abdomen deformados, en los tratamientos s_8, s_9, s_{10} se observaron adultos deformes dentro de la exuvia pupal que no emergieron.

Porcentaje de emergencia de adultos hembra

En el análisis de variancia se detectó alta significancia estadística para los sustratos. El promedio general fue de 65.67 % de emergencia. El CV fue de 10.58%, valor excelente. Tukey al 5 %, Cuadro 6, detectó dos rangos de significación, encabezado por los sustratos s_1, s_7 y s_{11}, con un porcentaje de emergencia del 100.0, 100.0, y 85.55%.

Cuadro 6. Tukey al 5 % para porcentaje de emergencia de adultos hembra en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *N. elegantalis* (G.). Tumbaco-Pichincha. 2010.

Sustratos	% Emergencia	Rangos de significación
s_1	100.00	a
s_7	100.00	a
s_{11}	85.55	a
s_8	0.0	b
s_9	0.0	b
s_{10}	0.0	b

La ocurrencia de la descomposición acelerada de frutos de berenjena contaminó el 14.45 % de prepupas, lo cual repercutió en el porcentaje de emergencia.

Hembras procedentes de s_1 se mostraron vigorosas y sanas, sin presencia de malformaciones en alas ó abdomen, lo cual indica que la composición de s_1 pudo satisfacer las necesidades nutricionales de *N. elegantalis*.

La totalidad de adultos procedentes de s_7 mostraron alas y abdomen malformados, lo cual pone de manifiesto que el ácido ascórbico es esencial en el desarrollo de *N. elegantalis*.

Días a la emergencia de adultos macho

En el análisis de variancia se detectó alta significancia estadística para sustratos. El promedio general fue de 18.79 días a la emergencia. El CV fue de 4.30 %, valor excelente. Tukey al 5 %, Cuadro 7, detectó dos rangos de significación, encabezado por los sustratos s_{11} y s_1, con 16.33 y 17.50 días, respectivamente.

Cuadro 7. Tukey al 5 % para días a la emergencia de adultos macho en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *N. elegantalis* (G.). Tumbaco-Pichincha. 2010.

Sustratos	Días a la emergencia	Rangos de significación
s_{11}	16.33	a
s_1	17.50	a
s_7	21.67	b

El período de emergencia de adultos procedentes de s_1 no difirió de s_{11}, por tanto se deduce que la cronología de desarrollo pupal no se vio afectada en individuos desarrollados en s_1, sino que fue similar a la del hospedero natural.

La emergencia de los adultos de s_7 se vio prolongada, lo cual sugiere que la ausencia de ácido ascórbico en el sustrato repercutió en el desarrollo del adulto.

Días a la emergencia de adultos hembra

En el análisis de variancia se detectó alta significancia estadística para sustratos. El promedio general fue de 17.21 días. El CV fue de 4.53 %, valor excelente.

Tukey al 5 %, Cuadro 8, detectó dos rangos de significación, encabezado por los sustratos s_{11} y s_1, con 15.67 y 17.00 días, respectivamente.

La cronología de emergencia de hembras procedentes de s_1 fue similar a la de individuos procedentes del hospedero natural, lo que sugiere que los procesos metabólicos de s_1 fueron normales.

Cuadro 8. Tukey al 5 % para días a la emergencia de adultos hembra en la evaluación de sustratos en el desarrollo de larvas de *n. Elegantalis* (g.). Tumbaco-pichincha. 2010.

Sustratos	Días a la emergencia	Rangos de significación
s_{11}	15.67	a
s_1	17.00	a
s_7	19.75	b

El período a la emergencia se vio prolongado en adultos procedentes de s_7, lo cual sugiere que la carencia de ácido ascórbico repercutió en el desarrollo de los adultos hembra.

2.2.5.5. Conclusiones

- En la evaluación de once sustratos sobre el desarrollo de larvas de *N. elegantalis*, se evidenciaron respuestas diferentes del insecto en la aceptación de los sustratos, lo cual se reflejó en el porcentaje de larvas recuperadas, peso de pupas, días a la emergencia de adultos, porcentaje de emergencia y malformaciones, debido a las características incitantes y estimulantes propias de cada sustrato.

- Los sustratos s_{11} y s_1 fueron los mejores sustratos para el desarrollo de larvas de *N. elegantalis*, lo cual se evidenció en las variables evaluadas. El sustrato s_{11}, por ser hospedero natural del insecto, registró el mayor porcentaje de larvas recuperadas, mayor peso pupal, menor período a la emergencia de adultos, y ausencia de adultos malformados. El sustrato elaborado s_1 generó individuos con características similares a los procedentes del hospedero natural, el cual registró el mayor porcentaje de emergencia de adultos sanos, sin malformaciones. Por lo cual, los sustratos s_{11} y s_1 se constituyeron en los óptimos para el establecimiento de la cría de *N. elegantalis* en condiciones de laboratorio.

2.2.5.6. Recomendaciones

- Identificar bioquímicamente los elementos incitantes presentes en los hospederos naturales de *N. elegantalis*, y su uso en los sustratos de desarrollo larval.

- Se recomienda integrar dos módulos de cría de *N. elegantalis*: (1) sobre berenjena con el objetivo de mantener el pie de cría, por su viabilidad y, (2) sobre el sustrato elaborado s_1 por generarse material biológico sano, vigoroso y libre de contaminantes requerido para la realización de ensayos microbiológicos y entomológicos.

2.2.5.7. Bibliografía

Angulo, R. 2006. Lulo: El cultivo. Bogotá, CO, Colciencias.100 p.

Gallegos, P; Asaquibay C; Arroyo, M. 2006. Control del barrenador del fruto de la naranjilla (*Neoleucinodes elegantalis*) mediante productos de baja toxicidad. In INIAP. ed. Informe Anual del Departamento de Protección Vegetal. Quito, EC. p. 5-10.

Parra, J.R. 1991. Consumo e utilizaç◈o de alimentos por insetos. In Panizzi, AR; Parra, JR. eds. Ecología nutricional de insetos e suas implicaçones no manejo de pragas. S◈o Paulo, BR. P. 9-65.

Revelo, J; Sandoval, P. 2003. Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (*Solanum quitoense*) en la región amazónica del Ecuador: Proyecto Manejo Integrado de Plagas para el Mejoramiento de la Producción Sostenible de Frutas en la Zona Andina. Quito, EC, INIAP. 117 p.

Sosa, C. 2009. Prospección e identificación de enemigos naturales del barrenador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* y evaluación de la incidencia de las principales plagas en el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense*) en las zonas productoras. Tesis Ing. Agr. Quito, EC, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 86 p.

2.2.6. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *quitoense* en la Sección Lasiocarpa[21].

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.6.1. Marco Referencial

Considerando que la naranjilla se cultiva en ecosistemas muy frágiles, como la selva amazónica, donde el uso de productos químicos no es la mejor opción dentro de un enfoque moderno de defensa del medio ambiente, la desinfección de semilla y el uso de patrones resistentes son a corto plazo las alternativas de control de *F. oxysporum,* pero estas prácticas necesitan procesos de adopción, los cuales son a veces difíciles de implementar. Por estas razones la resistencia de la Sección *Lasiocarpa* del INIAP, se encontró que todas las accesiones de *S. quitoense* fueron susceptibles al patógeno, mientras que la mayoría de accesiones de *S. pectinatum, S. stramonifolium, S, hirtum, S pseudolulo, S, tequlense, S. sessiliflorum* y el híbrido INIAP Palora presentaron resistencia. En este estudio el híbrido Puyo presentó síntomas tardíos y la colonización vascular de *F. oxysporum* fue menor que las de las accesiones de *S. quitoense.*

En un estudio de la reacción a *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* de una colección, mientras que el híbrido INIAP-Palora fue completamente resistente (Gallardo, 2005). Al momento en el híbrido Puyo se han presentado epidemias severas y en el híbrido INIAP-Palora se ha observado síntomas de la enfermedad, por lo que

[21] Lucía Manangón, José Ochoa

parece que nuevas poblaciones de *F. oxysporum* f.sp. *quitoense* han evolucionado y se hace necesario actualizar el estudio de patogenicidad de la enfermedad involucrando un mayor número de aislamientos del patógeno, teniendo en cuenta el lugar y el hospedero de donde procedan.

La resistencia genética es la estrategia más conveniente de manejo de la MVN, su durabilidad depende de la capacidad de adaptación del patógeno por el desarrollo de nuevas razas, al momento los niveles de resistencia del híbrido Puyo no son suficientes y ya se observan síntomas de la MVN en el híbrido INIAP-Palora. Esto significa que la población del patógeno ha evolucionado.

La presente investigación buscó contribuir al entendimiento del potencial evolutivo en la población de *F. oxysporum* f.sp. *quitoense* agente causal de la "Marchitez Vascular de la Naranjilla", con el fin de optimizar la utilización práctica de la resistencia presente en la Sección Lasiocarpa.

2.2.6.2. Metodología

Antes de iniciar el ensayo, se partió de unas pruebas preliminares que consistieron en la inoculación de los aislamientos del hongo *F. oxysporum* en plantas de naranjilla susceptibles al patógeno para confirmar la virulencia de los distintos aislamientos que actualmente se conservan en arena.

Las semillas de las plantas de la sección Lasiocarpa se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos y luego fueron lavadas con agua estéril por tres ocasiones, posteriormente se trataron con ácido giberélico a 1250 ppm, por un día para estimular la germinación, inmediatamente después se colocaron en cajas de Petri con papel absorbente estéril y se ubicaron en una estufa a una temperatura de 23ºC. Tan pronto las plántulas alcanzaron dos centímetros, fueron llevadas a fundas con sustrato estéril para su crecimiento. Cuando las plantas obtuvieron 10 cm. de altura fueron transplantas a camas, las cuales contenían sustrato previamente esterilizado e inoculado con clamidósporas de cada uno de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp *quitoense* a una dosis de 5000 unidades formadoras de colonia (UFC)/ gramo. Posteriormente se evaluó las dos variables diariamente

Los híbridos se propagaron por vía asexual seleccionando la parte apical de plantas sanas, vigorosas y de preferencia de ramas de 2 o más años con 3 a 4 yemas laterales. Las estacas se cortaron en pedazos de 30 cm de largo. La siembra de las estacas se realizó en fundas plásticas con 500 gramos de sustrato compuesto de humus de lombriz, tierra negra y pomina; en proporción 2:2:1. La porción basal de cada estaca se enterró oblicuamente hasta 10 centímetros de profundidad. Tres meses después de la siembra, se procedió a la inoculación de cada uno de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp *quitoense* a una dosis de 5000 unidades formadoras de colonia (UFC)/g

El sustrato se inoculó de acuerdo al método desarrollado por Larkin (1993) y adaptado al cultivo de naranjilla por Gallardo (2005). En el medio líquido papa-dextrosa (PD) se sembró un segmento de micelio de un cultivo monospórico del hongo de 5 días de edad, luego el medio con el inoculante permaneció en agitación constante por 15 días. El micelio desarrollado se homogenizó en una licuadora durante 10 segundos y con el uso de una jeringuilla se inoculó 50 cc de suspensión en 1000 gramos de arena fina estéril, contenida en una funda plástica. La arena inoculada permaneció en el invernadero a 23ºC y 70% de HR por cuatro semanas, hasta que se seque. Este proceso, permitió la formación de clamidósporas; cuya concentración se definió sembrando en PDA diferentes diluciones peso / volumen del inoculante.

El riego se realizó pasando un día utilizando 100 cc de agua por planta, el último mes de evaluación el riego fue diario. Se aplicaron fertilizaciones cada 15 días antes de la inoculación utilizando nitrofoska azul (12-12-17-2+ME) a una dosis de 1 g por planta.

Se utilizó Buprofezin a 2.5 cc/l agua para mantener baja la incidencia de mosca blanca en la investigación.

2.2.6.3. Resultados y discusión

Debido a la muerte de las estacas de los híbridos Puyo e INIAP-Palora, por ausencia de prendimiento, estos materiales no fueron tomados en cuenta en este estudio.
A consecuencia de la gran variabilidad y a la eliminación de diferentes unidades experimentales se vio conveniente hacer la discusión en términos generales estableciendo Cuadros por categorías y utilizando una estadística no paramétrica para cada una de las especies de la sección Lasiocarpa y para los aislamientos de *F. oxysporum.*

La infección causada por *F. oxysporum* es uno de los problemas vasculares más graves que tiene esta especie frutícola, en razón de que presenta síntomas que al inicio pueden verificarse como marchitez regresiva y con el tiempo causa la muerte de la planta. Al realizar un corte transversal en el tallo se observa el xilema decolorido.

Análisis de resistencia a F. oxysporum

S. quitoense

Al aplicar la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. quitoense*, se observa que las accesiones fueron estadísticamente iguales para la variable periodo de establecimiento de la enfermedad a nivel 3. El promedio de días más alto para estas accesiones le correspondió a la accesión 229 con 101, 63 días y la accesión que tardó menos tiempo fue la 109 con 95,15 días posteriores a la inoculación.

En los resultados de aplicación de la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. quitoense*, se observan diferencias significativas para la variable nivel 3 de colonización vascular. Las accesiones 94, 211 y 229 de *S. quitoense* presentaron un nivel igual de colonización; en cambio, la accesión 105 manifestó un nivel de 3,03 y la accesión 109 un nivel de 3,4; sin embargo, todas las accesiones fueron susceptibles a los aislamientos de *F. oxysporum*. Es importante mencionar que las accesiones 94, 105 y 109 no fueron afectadas por el aislamiento 12 de *F. oxysporum* (aislamiento de Híbrido Palora.

S. sessiliflorum.

En los resultados del análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. sessiliflorum*, se observa la reacción de resistencia o incompatibilidad al nivel de colonización 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentaron las accesiones 47, 53, 210 y 296 de *S. sessiliflorum* a la inoculación de 15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión 128 presentó reacción de susceptibilidad al nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para uno de los aislamientos, esta reacción correspondió al aislamiento 10.

S. hirtum

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. hirtum*, se observó la reacción de resistencia o incompatibilidad, nivel de colonización 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentaron las accesiones 2, 83, 253 de *S. hirtum* a la inoculación de 15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión 124 exhibió reacción de susceptibilidad, nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para uno de los aislamientos, esta reacción correspondió al aislamiento 14. La accesión más resistente al patógeno fue la accesión 83 de *S. hirtum*

S. tequilense

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. tequilense,* se observa la reacción de resistencia o incompatibilidad, nivel de colonización 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentaron las accesiones 285 y 286 de *S. tequilense* a la inoculación de 15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión 1 presentó reacción de susceptibilidad al nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para uno de los aislamientos, esta reacción correspondió al aislamiento 1. La accesión 62 también presentó reacción de susceptibilidad al nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para dos de los aislamientos, estas reacciones correspondieron a los aislamientos 12 y 14.

S. pectinatum

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. pectinatum*, se observa la reacción de resistencia o incompatibilidad al nivel de colonización 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentaron las accesiones 57, 209 y 295 de *S. pectinatum* a la inoculación de 15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión 500 presentó reacción de susceptibilidad al nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para uno de los aislamientos, esta reacción correspondió al aislamiento 14.

S. pseudolulo

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para accesiones de *S. pseudolulo*, se observa la reacción de resistencia o incompatibilidad, nivel de colonización 0,1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentaron las accesiones 117, 297, 298 y 308 de *S. pseudolulo* a la inoculación de 15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión 221 manifestó reacción de susceptibilidad, nivel de colonización 3 (Decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) para cuatro de los aislamientos, estas reacciones correspondieron a los aislamientos 4, 11, 14 y 15. La accesión 272 presentó reacción de susceptibilidad (nivel de colonización 3), para uno de los aislamientos, esta reacción correspondió al aislamiento 11.

S. hyporhodium* y *S. stramonifolium

Se observa la reacción de resistencia o incompatibilidad al nivel de colonización 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) que presentan las accesiones 268 de *S. hyporrhodium* y la accesión 8 de *S. stramonifolium* a la inoculación de15 aislamientos de *F. oxysporum*, la accesión

2.2.6.4. Resultados y discusión

De manera general se puede apreciar la reacción de resistencia o incompatibilidad y de susceptibilidad o compatibilidad de los aislamientos de *F. oxysporum* evaluados en este estudio.

Para las reacciones de incompatibilidad se consideraron aquellas que presentaron nivel de colonización 0 (sin evidencia de daño), nivel de colonización 1(lesiones corticales de la raíz) y nivel de colonización 2 (decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz); mientras que las reacciones de compatibilidad fueron aquellas que presentaron nivel de colonización 3 (decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta) y nivel de colonización 4 (decoloración de moderada a severa del sistema vascular de toda la planta) Figura 5.

Las accesiones correspondientes a *S. quitoense* manifestaron niveles de colonización 3 y 4 que corresponde a un proceso de compatibilidad con *F. oxysporum*; en contraste, se aprecia que las otras accesiones manifestaron niveles de colonización 0, 1 y 2 que en la práctica corresponde a niveles de incompatibilidad entre las accesiones y el agente causal.

Análisis de patogenicidad

Aislamientos de *F. oxysporum*

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall Wallis para 15 aislamientos de *F. oxysporum,* no se observan diferencias significativas para la variable periodo de establecimiento de la enfermedad; sin embargo, se puede mencionar de manera general que las accesiones de *S. quitoense* presentaron nivel 3 de sintomatología entre 90 y 100 días luego de la inoculación; con relación a esta variable cabe señalar que Báez (2003), para el nivel de infección 3 determinó que los días promedios comprendidos entre la inoculación y aparecimiento de síntomas fueron 26,3 y 46 que contrastan con los alcanzados en esta investigación, lamentablemente no se conoce el aislamiento utilizado en la investigación de Baéz; pero, es importante resaltar que la metodología de inoculación fue similar en ambos casos, muy probablemente la diferencia puede deberse a la capacidad infectiva de los aislamientos y el material de las accesiones.

En los resultados de los análisis, mediante la prueba de Kruskall y Wallis para 15 aislamientos de *F. oxysporum*, no se observan diferencias significativas para la variable nivel de colonización vascular.

En la Figura 5 se presenta la reacción de resistencia (-) o incompatibilidad y de susceptibilidad (+) o compatibilidad de los aislamientos evaluados en este estudio. Para las reacciones de incompatibilidad se consideraron aquellas que presentaron colonización vascular de 0, 1 y 2 (sin evidencia de daño, lesiones corticales de la raíz y decoloración leve del sistema vascular limitada a la raíz, respectivamente) mientras que las reacciones de compatibilidad fueron aquellas que presentaron niveles de colonización vascular de 3 y 4 (decoloración leve del sistema vascular en gran parte de la planta y decoloración de moderada a severa del sistema vascular de toda la planta, respectivamente); cabe resaltar que la decoloración que se observó en el sistema vascular es el resultado de la formación de pigmentos melanoides en los tejidos vasculares de acuerdo a Sarasola y Roca (1975).

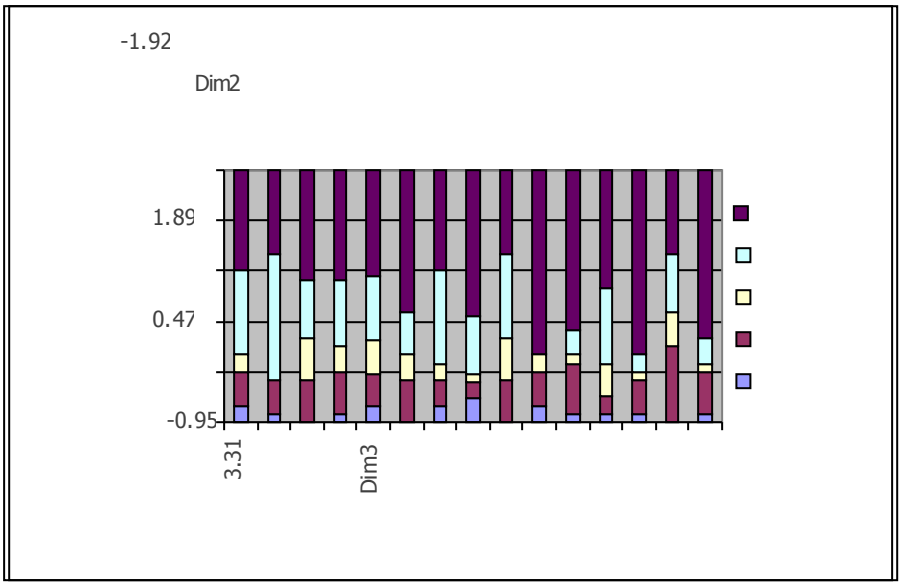


Figura 5. Nivel de colonización vascular causadas por varios aislamientos de *F. oxysporum.* – EESC. Cutuglahua – Pichincha. 2009.

De acuerdo a este criterio todos los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp*. quitoense* a excepción del aislamiento 12 fueron patogénicos en todas las accesiones de naranjilla (ya que produjeron colonización vascular en todas las accesiones de *S. quitoense*. Gallardo (2005), no observó diferencias de patogenicidad entre los cuatro aislamientos de *F. oxysporum* que utilizó en su investigación. Se debe enfatizar que el aislamiento 12 fue obtenido del Híbrido Palora que no presentó compatibilidad con las accesiones 94, 105 y 109 de *S. quitoense*. Los aislamientos 1, 4, 10, 11 y 14 produjeron además colonización vascular en ciertas accesiones de otras especies diferentes a *S. quitoense*, y aunque la compatibilidad está asociada con el nivel de colonización vascular 3, que a veces son difíciles de discriminar del nivel 2, estos aislamientos pueden considerarse más patogénicos que los demás aislamientos. El aislamiento 14 fue el más patogénico ya que colonizó a accesiones de *S. hirtum, S. tequilense, S. pectinatum y S. pseudolulo*. El aislamiento 11, fue también patogénico en dos accesiones de *S. pseudolulo* y se puede considerar muy patogénico en esta especie. Los aislamientos 4 y 15 también fueron patogénicos en *S. pseudolulo*.

2.2.6.5. Conclusiones

- Todos los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp*. quitoense* a excepción del aislamiento 12 son patogénicos en todas las accesiones de naranjilla.
- La patogenicidad de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *quitoense* a excepción del aislamiento 12 no está aparentemente asociada ni con el origen del hospedante, ni con el origen geográfico. Es decir que el aislamiento no es más patogénico si viene de naranjilla común o del hibrido Puyo, o si el aislamiento viene de alguna región en especial.

- La falta de variabilidad del patógeno se puede deber a que no se han expuesto fuentes de resistencia al mismo, ya que el patógeno es virulento a todas las variedades de naranjilla común y al hibrido Puyo, los que no tienen fuentes de resistencia. Adicionalmente el patógeno tiene reproducción asexual y al ser un patógeno de suelo, la variación producida por mutaciones tiene pocas probabilidades de detectarse.
- La presencia de esta población homogénea de *F. oxysporum* f. sp*. quitoense* en todo el país se debe a la transmisión del patógeno por semilla. A través de la semilla, el agricultor inconscientemente ha trasmitido el patógeno a todas las áreas del cultivo de naranjilla en el país.
- Algunas de las accesiones de *S. sessiliflorum, S. tequilense, S. hirtum, S.pectinatum y S. pseudolulo*, desarrollaron síntomas de la MVN y presentaron colonización vascular de *F. oxysporum.*
- Todas las accesiones de *S. quitoense* desarrollaron síntomas de la MVN y presentaron colonización vascular en la evaluación de los aislamientos de *F. oxysporum*, a excepción de las accesiones 94, 105 y 109 que no desarrollaron síntomas de la MVN ni presentaron colonización vascular para el aislamiento 12.
- La accesión 221 de *S. pseudolulo* presentó nivel 3 de colonización en los aislamientos 4, 11, 14 y 15, siendo esta la única accesión de *S. pseudolulo* afectada por 4 aislamientos.
- La accesión 8 de *S. stramonifolium* y la accesión 268 de *S. hyporhodium* presentaron resistencia (nivel 0 y 1) a los 15 aislamientos de *F. oxysporum.*
- El aislamiento 12, es diferente a todos los aislamientos antes analizados, es solo patogénico en las accesiones 211 y 229 de *S. quitoense*. Este aislamiento es por lo tanto poco patogénico ya que no es capaz de infectar accesiones de *S. quitoense*, que regularmente son susceptibles, parece pertenecer a una población diferente de *F. oxysporum*. Es probable entonces que este aislamiento haya evolucionado para infectar especialmente el hibrido INIAP-Palora.

2.2.6.6. Recomendaciones

- Evaluar los aislamientos más patogénicos en nuevas pruebas de inoculación del hongo *F. oxysporum* para comprobar su patogenicidad
- Evaluar el aislamiento procedente del Híbrido INIAP-Palora, debido a que parece ser menos patogénico para naranjilla común
- Utilizar las accesiones resistentes a *F. oxysporum,* que pueden cruzarse con naranjilla común para desarrollar variedades de naranjilla resistentes a *F. oxysporum.*
- *E*valuar la compatibilidad de las accesiones resistentes de *S. hirtum, S. pectinatum, S. pseudolulo, S. stramonifolium* y *S. sessiliflorum* para ser utilizadas como patrones en naranjilla común.

2.2.7. Evaluación agronómica y resistencia a nemátodos *(Meloidogyne incógnita)* y al hongo *(Fusarium oxysporum)* de dos variedades de naranjilla injertas en siete accesiones de la Sección L asiocarpa noroccidente –pichincha[22].

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.7.1. Objetivos

Objetivo General

Evaluar y seleccionar con base al comportamiento agronómico y la calidad del fruto de la naranjilla común (*S. quítense* Lam) y del híbrido Puyo, injertados en siete patrones de solanáceas con resistencia – tolerancia a nemátodos (*Meloidogyne incógnita)* y marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*) en el Noroccidente de Pichincha.

Objetivos Específicos

- Evaluar el grado de afinidad y compatibilidad de los cultivares de naranjilla Común e híbrido Puyo injertados en siete porta injertos provenientes de semilla sexual y asexual (estaca).
- Seleccionar los porta injertos que presenten tolerancia-resistencia a *Meloidogyne incógnita* y *Fusarium oxysporum.*
- Evaluar el comportamiento agronómico de plantas de naranjilla de los cultivares Común e híbrido Puyo.
- Realizar el análisis económico de presupuesto parcial.

2.2.7.2. Marco Referencial

Las principales enfermedades del cultivo de naranjilla son: "Marchitez vascular", "Fusariosis" o "Mal seco" (*Fusarium oxysporum*), "Antracnosis" o "Pudrición del fruto" (*Colletrotrichum gloeosporoides*),"Lancha" o "Tizón tardío" (*Phytophthora infestans*), "Marchitez bacterial", "Marchitamiento"o "Dormidera" (*Pseudomonas solanacearum*). Entre las principales plagas se encuentran: "Nemátodos" *(Meloidogyne incognita)*, "Gusano del fruto", "Perforador del cuello" o "Barrenador del tallo". (CELLERI, A. 1954,INIAP 1982, JIJÖN, R. 1982, SILVA, J. 1986, SORIA, J. 1989, MAG 1994, INIAP 1995, FIALLOS, J. 2000). Ochoa, J., et. al., 2000, la "Marchitez vascular" (*Fusarium oxysporum) en* naranjilla, fue reportada por primera vez en el valle de Pastaza. En la actualidad la incidencia se ha dispersado a consecuencia de la siembra de estacas provenientes de plantas enfermas (SILVA, J. 1986).

Fusarium es un hongo que se encuentra ampliamente distribuido en los suelos agrícolas del Ecuador. Este patógeno es muy destructivo ya que produce

[22] Amanda Chiluisa, Jenny Herrera, Wilson Vásquez, Pablo Viteri, Juan León

marchitamiento, empardecimiento de las hojas y los vástagos suculentos de la planta. *Fusarium* inicialmente afecta el interior del tallo produciendo áreas de color café, cuyo corte transversal deja ver una decoloración negra en el sistema vascular en forma de anillo y cuando el patógeno ha invadido todos los vasos conductores, se produce una marchitez generalizada, que produce la muerte lenta y descendente de la planta.

Según Revelo (1991), los nematodos fitoparasitarios no causan síntomas inmediatos en la parte superior de la planta y pueden permanecer por varios años en el suelo sin que se detecte su presencia. El primer síntoma es un crecimiento retardado de la planta. Se puede presentar una reducción en el crecimiento de las raíces. Las plantas atacadas pierden su color natural, presentan clorosis que usualmente es asociada con una deficiencia de nutrientes, se ven achaparradas enfermas y se marchitan fácilmente durante las horas más calurosas y secas del día. Las plantas pierden la capacidad de absorber agua y nutrientes del suelo. *Meloidogyne incognita,* presentan numerosas agallas que favorecen la entrada de otros patógenos, como hongos y bacterias, ocasionando pudrición de raíces y debilidad de la planta.

Estudios realizados por Morales y Maya (1982) señalan que el problema en naranjilla es aún mayor ya que encontraron una interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*. Esto concuerda con lo señalado por Agrios (1995), quien menciona que algunos nemátodos del suelo generalmente incrementan la incidencia de la marchites, debido posiblemente a la presencia de un mayor número de puntos efectivos de penetración del hongo, causando pérdidas económicas a los agricultores (CORPOICA. 2002). La alta susceptibilidad de la naranjilla a nemátodos, reduce la vida útil de la planta de 5 años a 1 o 2 años dependiendo de la severidad del ataque, situación que obliga a los agricultores a buscar terrenos nuevos, talando el bosque para luego abandonarlos (SORIA, J. 1989). Debido a que es un cultivo muy susceptible a plagas y enfermedades los agricultores recurren al uso excesivo de fungicidas, nematicidas e insecticidas que provocan alta toxicidad en el fruto (CORPOICA. 2002). Esto evidencia la falta de capacitación de los agricultores sobre manejo racional de los mismos, situación que ocasionan incremento de los costos de producción y contaminación del ambiente (suelo, agua) y afecta a la salud de productores y consumidores principalmente. (REVELO, J; SANDOVAL, P. 2003)

Con el fin de contribuir al mejoramiento del cultivo naranjilla, investigaciones realizadas por HEISER (1972 y 1989), RON (2003), MONTALEZA y TROYA, (2003), confirman la existencia de accesiones de la sección Lasiocarpa e incluso cruzamientos de especies entre *S. vestissimun* y *S. hyporhodium* con *S. quitoense*, que toleran/resisten a *Meloidogyne* y *Fusarium*, mismos que pueden ser utilizados como portainjertos de naranjilla, esta sería una alternativa para combatir los problemas fitosanitarios en mención; por lo tanto, es necesario evaluar en campo de agricultores, la resistencia o tolerancia de estos materiales silvestres y la compatibilidad como portainjertos de la naranjilla Común y del

híbrido Puyo. Esto permitirá dar una solución sostenible a estos dos problemas fitosanitarios en beneficio de productores, consumidores y ambiente.

El presente estudio permitirá evaluar la afinidad, compatibilidad, comportamiento agronómico y resistencia/tolerancia a la marchitez y nemátodos de dos cultivares de naranjilla (Común e Hibrido puyo) injertadas en varios patrones de Solanáceas; y con base al análisis económico, seleccionar los más eficientes, para uso comercial.

2.2.7.3. Metodología

La fase de invernadero se realizó en la Granja Experimental Tumbaco del INIAP, ubicada a una altitud de 2384 m, una temperatura promedio anual de 15.7 ºC, precipitación promedio anual de 867.3 mm y 73% de humedad relativa. Está clasificada en la zona ecológica Bosque seco montano bajo (bsMB), la plantación definitiva se realizo en San Miguel de Saloya-Los Bancos en la provincia de Pichincha, con una[23]: altitud de 1 200 msnm., precipitación promedio anual de 2000 mm., temperatura promedio anual de 21.5 ºC., humedad relativa de 90 %, además a una zona agroecológica de bosque húmedo Montano Bajo (bhMB) (Cañadas, 1983).
El análisis estadístico se realizó con base al Diseño de Bloques Completos al Azar con cuatro repeticiones en arreglo factorial 7x2+2. La unidad experimental estuvo formada por seis plantas por lo que se están evaluando 384 plantas. La distancia de plantación entre plantas e hileras fue de 2 m.

Cuadro 1. *Descripción de los tratamientos.*

Tratamientos	Codificación	DESCRIPCIÓN
t1	C1p1	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum pseudolulo*
t2	C1p2	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum hirtum*
t3	C1p3	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum hispidum*
t4	C1p4	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum quitoense* x *Solanum vestissimun*
t5	C1p5	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum quitoense x Solanum hyporhodium*
t6	c1p6	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum quitoense x Solanum hyporhodium) x Solanum quitoense* cultivar dulce
t7	c1p7	*Solanum quitoense* cultivar Común en *Solanum pectinatum*
t8	c2p1	híbrido Puyo en *Solanum pseudolulo*
t9	c2p2	híbrido Puyo en *Solanum hirtum*
t10	c2p3	híbrido Puyo en *Solanum quitoense dulce x Solanum hispidum*
t11	c2p4	híbrido Puyo en *Solanum quitoense x Solanum vestissimun*
t12	c2p5	híbrido Puyo en *Solanum quitoense x Solanum hyporhodium*
t13	c2p6	híbrido Puyo en *Solanum quitoense x Solanum hyporhodium) x Solanum quitoense* cultivar dulce
t14	c2p7	híbrido Puyo en *Solanum pectinatum*
t15	c1	*Solanum quitoense* cultivar Común sin injertar (testigo)
t16	c2	híbrido Puyo sin injertar (testigo)

[23]INAMHI-2005.

Las variables que se evaluaron en la fase invernadero y campo fueron: Peso y número de semillas por fruto. Inicio de germinación de la semilla (días). Germinación (%).Días a la injertación. Estacas prendidas (%).Afinidad de los injertos (%).Altura de planta (cm.). Diámetro del tallo del patrón y del injerto (cm), Número de flores por inflorescencia. Inicio de la floración (días). Floración (días). Inicio del cuajado del fruto (días). Frutos cuajados %. Cosecha (días). Tamaño del fruto. Rendimiento por planta (kg/24 m^2.) y (kg/ha). Compatibilidad de los injertos. Sobrevivencia (%).Incidencia de la marchitez vascular. Incremento de la población de nemátodos

En la fase invernadero y campo del ensayo se realizaron las labores de manejo planificadas como: preparación del terreno, riegos, deshierbas, fertilizaciones, controles fitosanitarios, podas, tutoreo de plantas.

2.2.7.4. Resultados y discusión

FASE DE INVERNADERO.

En esta fase se utilizaron materiales provenientes de semilla (S. p*seudolulo*, S. *hirtum*, S. *pectinatum*, S. *hispidum*, Cultivar Común) y de estaca (S*. quitoense* x *S. hyporhodium*, *S. quitoense* x *S. vestissimun*, *(S. quitoense x S. hyporhodium) x S. quitoense dulce,* Híbrido Puyo*.*

En el Peso y número de semillas por fruto el mayor peso alcanzo el cultivar Común presento con un peso de fruto con 36g y con un número de semillas de 1618.

En días y porcentaje de germinación se obtuvo que la naranjilla Común es la que más tardo en germinar con 17,25 días a la germinación pero es la que mayor porcentaje se obtuvo con 95.94% de plántulas germinadas y el patrón *S. hispidum* (t4) es el que germino un poco presento 10,50 días a la germinación con un porcentaje de 79.69% de plántulas germinadas

En cuanto a los materiales reproducidos de forma asexual se obtuvo que el t2 (*S. quítense x S. hyporhodium*) es el que mayor enraizamiento (58 75%) tiene a los 30 días y que alcanzo un 97.50% a los 60 días. Por otra parte *(S. quítense x S hyporhodium) x S. quítense* cultivar dulce (t3), *S*. *quítense* dulce x *S*. *vestissimun* (t1) tienen los menores porcentajes de enraizamiento a los 30 días, sin embargo esta diferencia estadística a los 60 días desaparece, en otras palabras todos los tratamientos son estadísticamente iguales pese a existir una diferencia aritmética entre los tratamientos.

Días a la injertación entre variedades y patrones se obtuvo un promedio general de 133.89 días.

En cuanto a afinidad de loa injertos se obtuvo que el hibrido Puyo es el que mayor afinidad tiene (90.89 %) con relación a la naranjilla Común con 88.39 %. Por otra

parte el híbrido Puyo (t8) injertada en el patrón *S*. *pseudolulo* y en *S*. *hirtum* (t9) alcanzaron un porcentaje de afinidad mayor (100 %) con respecto al híbrido Puyo (t12) injertada en el patrón *S*. *quitoense* x *S*. *hyphorodium*) que tiene el menor porcentaje de afinidad con 73.75%

FASE DE CAMPO

ALTURA DE PLANTA.

Se obtuvo se obtuvo que la naranjilla común injerta en los patrones *S*. *hispidum (t3), S*. *speudolulo (t1) y S*. *hirtum (t2)* son los tratamientos que se destacaron con alturas entre 1.27 a 1.40 a los 150 días.

DIÁMETRO DEL TALLO DEL PATRÓN E INJERTO.

Presento que el hibrido puyo y la naranjilla Común injertas en el patrón *hispidum* se obtuvo los mayores diámetros con 4.53 y 4.37.Por otra parte en el Diámetro del tallo del injerto se obtuvo que la naranjilla Común injerta en el patrón *Solanum pectinatum* y *Solanum speudolulo.* Presentaron los mayores diámetros con 4.43 y 4.37

NÚMERO DE FLORES POR INFLORESCENCIA, INICIO, PLENA FLORACIÓN, INICIO CUAJADO (DÍAS).

Se obtuvo que el tratamiento t1, t2 y t7 con 14.05, 13.69 y 13.63 flores respectivamente. El inicio de floración y plena floración e inicio del cuajado se destacó la naranjilla común injerta en *S*. *pseudolulo* (t1) con 89.79 días al inicio, plena 102.23 y al cuajado 106.13 y la naranjilla común (t15 testigo) 87.52, 98.37 y 102.05.Por otra parte se aprecia que los tratamientos que tardaron en florecer fueron el híbrido Puyo injerta en *S*. *quitoense* x *S*. *hyphorodium* (t12) con 125.60 días y híbrido Puyo (t16 testigo) con 113.48.

El adelanto en la floración, determina una cosecha precoz. En la investigación la naranjilla Común (testigo) injerta en patrones producidos por semilla aceleraron la floración alrededor de 38 días, con respecto al híbrido Puyo (testigo) e injerta en patrones producidos por semilla y estaca.

Para plena floración transcurren 10 días más tarde del inicio de la floración alcanzo la floración la naranjilla común y plantas injertas el híbrido Puyo 15 días más tarde del inicio de floración, testigo e injertado en patrones producidos por semilla y estaca.

NÚMERO Y PORCENTAJE DE FRUTOS CUAJADOS.

Se obtuvo que la naranjilla Común injerta en el patrón (*S*. *quítense* x *S*. *hyporhodium*) x *S*. *quítense* cultivar dulce (t6) presento un número de 5.93 frutos con un porcentaje de 49.64 %.

DÍAS A LA COSECHA DESDE EL TRANSPLANTE E INICIO DE FLORACIÓN HASTA LA PRIMERA COSECHA.

La naranjilla Común injerta en el patrón *S. pseudolulo* fue precoz con 241.67 días, al considerar el periodo desde el trasplante a la primera cosecha
El tiempo que transcurre desde el trasplante a la cosecha la naranjilla Común injerto y testigo es de 8.80 meses. El tiempo que transcurre desde el trasplante a la primera cosecha en el híbrido Puyo injerto y testigo es de 7.91 meses. Mientras que entre especies no presentaron diferencia significativa.

El tiempo que transcurre desde el inicio de floración hasta la cosecha en la naranjilla Común injertado y testigo es de 4.24 meses, en el híbrido Puyo injerto y testigo es prácticamente similar (4.07 meses).

TAMAÑO DEL FRUTO.

De acuerdo a la escala planteada se clasifico los frutos en categorías en donde la primera categoría están los frutos que alcanzaron un diámetros mayores o iguales a 61 mm, la segunda categoría de 60-55 mm, tercera categoría de 54-51mm y cuarta y quinta categoría de 46 -41mm igual o mayor de donde se obtuvo que los frutos de los tratamientos alcanzaron porcentajes bajos dentro de la primera y segunda categoría.

Por otra parte la naranjilla Común injerta en los patrones *S. pectinatum* (t7), *S. hirtum* (t2), y *S. hispidum* (t3) con 38.46, 35. 62 y 32.00% respectivamente, se ubicó dentro de la tercera categoría, el híbrido Puyo injerta en los patrones *S. speudolulo* (t8), *S. pectinatum* (t14) y *S. hispidum* (t10) con 68. 43, 61. 17 y 59. 94 %respectivamente, se ubicó dentro de la cuarta y quinta categoría. La naranjilla Común (testigo), fue el tratamiento que alcanzó el porcentaje más alto de frutos caídos.

RENDIMIENTO kg/24m^{2,} Y kg/ha.

La naranjilla Común injerta en el patrón *S. hirtum* (t2) tanto por parcela como por hectárea presento el mayor rendimiento con 47.30 kg/24m^{2,} y 19710 kg/ha mientras que el híbrido Puyo injertado en el patrón *S. quitoense* x *S. hyphorodium* (t12) tubo el menor rendimiento 3.33 kg/24m^2 y 1387.08 kg/ha.

COMPATIBILIDAD DE LOS INJERTOS.

Esto se determinó por observación directa de acuerdo a las características agronómicas que presentó cada tratamiento (crecimiento, desarrollo y productividad). La naranjilla Común injerta en el patrón *S. speudolulo* y *S. hirtum* obtuvieron una alta compatibilidad de 94.40 y 92.16% respectivamente.

PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA.

Se obtuvo que el mayor porcentaje presento la naranjilla Común injerta en los patrones *S. hirtum* y *S*. *speudolulo* con 87.50 y 83.33. Por otra parte la naranjilla Común injerta en *S*. *quitoense* x *S*. *hyphorodium*) x *S*. *quitoense* cultivar dulce (t6) presentó el menor porcentaje con el 0%.

PORCENTAJE DE INCIDENCIA DE LA MARCHITEZ VASCULAR (*Fusarium oxysporum*).

Se obtuvo que la naranjilla Común (t15) e híbrido Puyo (t16) presentaron el mayor porcentaje de incidencia, alcanzando un 100% y 83.33% respectivamente. Esto afecto durante la fase de campo las plantas fueron afectadas en el crecimiento y desarrollo y acelerando la senescencia de la planta, afectado el rendimiento.

INCREMENTO DE LA POBLACIÓN DE NEMATODOS (*Meloidogyne incongnita*).

En el incremento de nemátodos se obtuvo que la naranjilla Común injerta en el patrón *S. hispidum* (t3) con 5.97 veces. Mientras que el híbrido Puyo injerta en el patrón *S*. *pectinatum* (t14) con apenas 0.18 veces.

De acuerdo a los criterios de Cook se calificó el índice del incremento del nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne incongnita*), se obtuvo la naranjilla Común injerta en el patrón *S*. *pseudolulo* (t1) con un índice de incremento de nematodo de 0.33 veces y un rendimiento de 37.63Kg/24m^2, es uno de los de mayor resistencia (t2), con un índice de incremento de nematodo de 0.37 veces con un rendimiento de 47.30Kg/24m^2, y la naranjilla Común injerta en el patrón *S*. *pectinatum* (t7) con un índice de incremento de nematodo de 0.25 veces con un rendimiento de 42.51Kg/24m^2 y obteniendo una calificación de RT (Resistente tolerante), por otro lado se observó que híbrido Puyo injerta en el patrón *S*. *hispidum* (t10) con un índice de incremento de 1.72 veces con un rendimiento de 9.59 Kg/24m^2 obtuvo una calificación de SNT(Susceptible no tolerante).

Con respecto a los testigos, la naranjilla Común (t15) presentó un índice de incremento de 0.65 veces con un rendimiento de 19.90Kg/24m^2 obteniendo una calificación de RT (Resistente tolerante), híbrido Puyo (t16) presentó un índice de incremento de 1.19 veces con un rendimiento de 9.71Kg/24m^2 obteniendo una calificación de ST (Susceptible tolerante).

El incremento en la población del nematodo del nudo de la raíz, incide notablemente en la reducción del rendimiento, apariencia de la planta, y en su longevidad. Con la técnica de la injertación, se pretende reducir el ataque de nematodos, como se observó en la raíces de los patrones *S*. *speudolulo, S*. *hirtum* que fueron resistentes lo que redujo la población del nematodo manteniendo las características antes mencionadas intactas.

ANÁLISIS ECONÓMICO/24m^2.

El análisis económico a través del presupuesto parcial basado en el método de Perrín publicado por el CIMMYT (2001), para un período de cosecha de tres meses se observa que la naranjilla Común injerta en el patrón *Solanum hirtum* (t2), presenta el mejor beneficio económico neto.

En el análisis por parcela experimental (constituida por 408 plantas) se obtuvo un beneficio neto de 505.48 dólares. Seguido de naranjilla Común injerta en el patrón *Solanum pectinatum* (t7) se obtuvo un benéfico neto de 409.66 dólares a pesar de que en este tratamiento las características agronómicas no fueron notorias.

Entre los testigos naranjilla Común e híbrido Puyo, el beneficio económico neto es de 370.08 y 99.62 dólares respectivamente, esto se atribuye a que la mano de obra para injertación no es necesaria y las semillas que se obtiene de uno a tres frutos es suficiente para una hectárea.

ANÁLISIS ECONÓMICO/ha.

Se observa que la naranjilla común injerta en el patrón *Solanum hirtum* (t2), presenta el mejor beneficio económico neto. En el análisis constituido por 2500 plantas se obtuvo un beneficio neto de 78095,00 dólares. Seguido de naranjilla común injerta en el patrón *Solanum pectinatum* (t7) se obtuvo un benéfico neto de 69763,51dólares a pesar de que en este tratamiento las características agronómicas no fueron notorias.

El beneficio económico neto de la naranjilla Común e híbrido Puyo, es de 34338,21y 16036,67 dólares respectivamente, esto se atribuye a que la mano de obra para injertación no es necesaria y el material (semillas) que se obtiene de uno a tres frutos es suficiente para una hectárea.

2.2.7.5. Conclusiones

- De los resultados obtenidos a nivel de invernadero, el híbrido Puyo injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum* presentaron el 100% de afinidad; mientras que la naranjilla común injerta en *Solanum pectinatum* presentó una afinidad de 98.75%, en otra palabras, la injertación entre las dos especies vegetales presentaron soldadura consistente.
- Los patrones producidos de semilla fueron los que presentaron mejores características de afinidad con respecto a los patrones producidos por estaca.
- Los materiales comerciales de naranjilla injertos en siete patrones de solanáceas del grupo Lasiocarpa presentaron una respuesta variable en crecimiento, desarrollo, afinidad y rendimiento.
- La naranjilla Común injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum* presentaron el mejor comportamiento agronómico y el mayor grado de

compatibilidad, pues su vigor y rendimiento fue superior a los otros tratamientos, con 15679.6 y 19710 kg/ha en tres meses de cosecha.

- De acuerdo al índice de incremento del nematodo *Meloidogyne incognita*, se concluye que la naranjilla Común injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum*, presentaron los índices más bajos de incremento de la población de nematodos (0.33 y 0.37 veces) siendo calificados como resistentes tolerantes al ataque. Mientras que para el resto de tratamientos el índice de incremento de la población de nematodos fueron altos y variados con rendimientos bajos por lo que fueron calificados como susceptibles no tolerantes y resistentes no tolerantes. Sin embargo la naranjilla Común injerta en *S. hispidum* es considerado tolerante, por no haber sido afectado el rendimiento.
- La alta incidencia de *Fusarium oxysporum*, en la naranjilla Común e híbrido Puyo (100 y 83.3% respectivamente) se les puede calificar como variedades susceptibles lo que afecto el rendimiento y calidad del fruto.
- Del análisis económico realizado, se concluye que la naranjilla Común injerta en patrones provenientes de semilla botánica, *Solanum pseudolulo* y *Solanum pectinatum* presentaron el mayor beneficio neto (505.5 y 409.7 dólares respectivamente) en tres meses de cosecha en una superficie de 24 m^2.

2.2.7.6. Recomendaciones

- Utilizar plantas de naranjilla injertas en patrones producidos por semilla *Solanum pseudolulo*, *Solanum hirtum* y *Solanum pectinatum*, por las mejores características agronómicas, afinidad, compatibilidad, y por la resistencia demostrada frente al ataque de *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita*.
- Utilizar los cultivares seleccionados con el objeto de elevar la longevidad, potencial productivo y mejorar la resistencia al perforador del fruto. Para su posterior recomendación a los agricultores.
- Proceder a transferir y capacitar a los productores, técnicos y estudiantes con las tecnologías desarrolladas para mejorar la productividad y calidad de la naranjilla en el Ecuador, preservado el ambiente y la salud humana.

2.2.7.7. Bibliografía

CELLERI, A. 1954. Curso de Botánica Sistemática Guayaquil. p. 476-481.

CORPOICA. 2002. El cultivo del lulo. 1era. Edición. Editor, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Manizales. p. 83-91.

HEISER, C. 2000. Interespecific hybridization and improvement of the naranjilla (*Solanum quitoense*). Fifth International Solanaceae Conference. In publish.

MORALES, G; MAYA, I. 1982. Identificación de enfermedades que afectan al cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense* L.), en las provincias de Tungurahua y Pastaza. Rumipamba. sp.

SILVA, J. 1986. Identificación y Determinación de resistencia de 22 introducciones de naranjilla distribuidas en 10 especies al nemátodo Meloidogyne sp. Tesis. Ing. Agr. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. p. 5-80.

2.2.8. "Evaluación y selección de reguladores de crecimiento que influyan en el tamaño del fruto de naranjilla híbrido puyo, que tenga baja residualidad, y que puedan reemplazar al 2-4D."24

2.2.8.1. Marco Referencial

Con el fin de incrementar el tamaño del fruto, los agricultores realizan aplicaciones de 2-4D, producto considerado como herbicida hormonal, que afecta la fisiología de las plantas provocando la sobreproducción de células, causando malformaciones en los diferentes órganos de la planta. La aceleración incontrolada del crecimiento agota las reservas alimenticias y determina la ruptura de los tejidos vasculares hasta causar la muerte de la planta. También, el 2-4D afecta la salud humana debido a los altos residuos detectados en la fruta. Con estos antecedentes se procedió a realizar un estudio con el objetivo de 1) evaluar y seleccionar productos químicos alternativos con diferentes dosis, que permitan mejorar el crecimiento de los frutos de naranjilla del híbrido Puyo y 2) realizar el análisis de costos de los tratamientos en estudio.

La presente investigación se realizó en San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha, localizada a 1100 m de altitud. Se utilizaron plantas de naranjilla híbrido Puyo (*Solanum quitoense x Solanum sessiliflorum*) injertas en Cujaco (*Solanum hispidum)*.

El estudio no detecto diferencias estadísticas entre tratamientos para el número de flores por inflorescencia. Sin embargo, se detectaron diferencias entre tratamientos para el número de frutos por inflorescencia y el tamaño del fruto. Con la información obtenida hasta el momento se puede indicar que los mejores tratamientos para incrementar el tamaño del fruto son T19, T20 y T21, correspondiente a Maxigrow–**excel** en dosis de 250, 500 y 750 cc / 200 l de agua. Este puede ser un producto que puede reemplazar al 2-4D.

El cultivo de naranjilla "común" (*Solanum quitoense)*, fue la base de la economía de muchos pueblos del Oriente ecuatoriano, pero a partir de los años setenta, se reduce la producción y productividad, debido al ataque de plagas, y susceptibilidad de las variedades cultivadas, que fueron reemplazadas con híbridos de menor calidad del fruto (5 y 3)

Actualmente el 50 % del área cultivada de naranjilla a nivel nacional corresponde al híbrido Puyo, el cual presenta frutos pequeños, debido a que *Solanum sessiliflorum* empleado como progenitor tiene esta característica. Con el fin de mejorar el tamaño del fruto, para hacerlo comercial, los agricultores realizan aplicaciones del herbicida 2-4D (2).

---

[24] Pablo Viteri D Juan León F. Wilson Vásquez C Diego Guitarra

El 2-4D pertenece al grupo de los herbicidas hormonales, ya que afecta la fisiología de las plantas en la misma forma que las auxinas naturales, provocando la sobreproducción de células en los tejidos generadores del crecimiento de la planta, lo cual causa malformaciones en los diferentes órganos de ésta. La aceleración incontrolada del crecimiento agota las reservas alimenticias y determina la ruptura de los tejidos vasculares hasta causar la muerte de la planta.

De acuerdo a la información obtenida en el "Taller de manejo integrado de la naranjilla" realizado por INIAP a finales del 2005, los productores del híbrido Puyo en la región oriental, realizan entre 4 a 6 aplicaciones de 2-4D, en dosis que van desde 20 - 100 gotas por bomba de 20 litros durante el ciclo del cultivo, teniendo un efecto en el raleo de flores y engrosamiento de frutos; además produce la deformación de hojas y reduce la longevidad de la planta. estudios realizados por Lucio y Espín (4) determinaron altos niveles de residualidad de este producto en los frutos de naranjilla.

La dioxina es el producto que se forma de la degradación del 2-4D. Todos los estudios realizados con animales han revelado que la dioxina es cancerígena y de efecto residual a largo plazo. Los investigadores están tratando de determinar si este residuo está asociado con el bajo coeficiente intelectual, problemas reproductivos y deficiencias del sistema inmunológico de los humanos.

En vista del uso generalizado del 2-4D para mejorar el tamaño de los frutos del híbrido Puyo y los efectos negativos para la salud humana por los residuos de éste, se planteó esta investigación con los siguientes objetivos: 1) evaluar y seleccionar productos químicos alternativos que mejoren el crecimiento de los frutos de naranjilla del híbrido Puyo en tres dosis, 2) realizar el análisis de costos de los tratamientos en estudio.

2.2.8.2. Metodología

La presente investigación se la realizó en San Miguel de los Bancos en la hacienda de la familia Bastidas-Herrera, localizada a 1100 m.s.n.m. Las características climáticas de la zona son: precipitación promedio anual de 2500 mm, temperatura promedio anual de 21.5 ºC y 90% de humedad relativa, además pertenece a la zona agroecológica bosque húmedo Montano Bajo (1)

Para el estudio se utilizaron plantas de Naranjilla híbrido Puyo (*Solanum quitoense x Solanum sessiliflorum*) injertas en Cujaco (*Solanum hispidum)*. Se empleó un Diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones. La unidad experimental estuvo formada por tres plantas de Naranjilla, siendo evaluadas un total de 270 plantas. La distancia de siembra entre plantas e hileras fue de 2 x 2 m.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el estudio

Tratamientos	Producto y dosis
T1	ANA 5ppm
T2	ANA 12.5 ppm
T3	ANA 20ppm
T4	AIA 5 ppm
T5	AIA 10ppm
T6	AIA 15 ppm,
T7	Cytoquin 250cc/200 l
T8	Cytoquin 500cc/200 l
T9	Cytoquin 750cc/200 l
T10	Ac. Giberelico 10% 5g/100 l
T11	Ac. Giberelico 10% 10g/100 l
T12	Ac. Giberelico 10% 5g/100 l
T13	Etherel 150 ppm
T14	Etherel 375 ppm
T15	Etherel 600 ppm
T16	Miros 3c/100 l
T17	Miros 5cc/100 l
T18	Miros 8cc/100 l
T19	Maxigrow –Excel 250 cc / 200 l
T20	Maxigrow –Excel 500 cc / 200 l
T21	Maxigrow –Excel 750 cc / 200 l
T22	Ergostim 150 cc/200 l
T23	Ergostim 200cc /200 l
T24	Ergostim 300 cc /200 l
T25	Raleo Quimico (Carbaril 800 ppm)
T26	Raleo Quimico (Carbaril 1400 ppm)
T27	Raleo Quimico (Carbaril 2000 ppm)
T28	Raleo Manual
T29	Testigo Agricultor (2-4D, 20 gotas)
T30	Testigo absoluto

Las variables consideradas fueron: días a la floración, número de flores por inflorescencia, número de frutos cuajados por inflorescencia, porcentaje de fructificación, días a la cosecha, número y diámetro de los frutos cosechados, peso de frutos, rendimientos, grados brix y análisis económico. Durante la fase de campo del ensayo se realizaron labores del manejo del cultivo de acuerdo a las necesidades como fue preparación del terreno, fertilizaciones, controles fitosanitarios, podas, y la cosecha del fruto que incluyó la selección y clasificación por categorías.

2.2.8.3. Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las diferentes variables evaluadas a nivel de campo.

Número de flores por inflorescencia

El número de flores por inflorescencia, 20 días después de la primera aplicación de los tratamientos, no causo efectos en esta variable ya que no se detectaron diferencias estadísticas para tratamientos ni dosis. El número promedio de flores por inflorescencia entre tratamientos fue de 8.4, con un rango de 7 a 8.9.

Número de frutos por inflorescencia

El ADEVA (Cuadro 2) para el número de frutos por inflorescencia evaluado a los 20 d después de la aplicación de los tratamientos, detecto diferencias estadísticas entre tratamientos, entre productos químicos, así como en la interacción productos

por dosis. El Coeficiente de Variación es 12.6%, el promedio general de frutos por inflorescencia es de 5.5.

F de V	GL	SC	CM
Total	**80**	**81.68**	
Tratamientos	26.00	54.78	2.11**
Productos	7.00	16.01	2.29**
Dosis	2.00	1.35	0.68ns
P x D	14.00	27.42	1.96**
Fact vs Testigos	2.00	32.59	16.29**
Repeticiones	2	1.71	0.86ns
E.Exper	52.00	25.19	0.48

Cuadro 2. Andeva para el número de frutos/inflorescencia a los 20 días de aplicado los tratamientos (frutos promedio por inflorescencia 5.54 y cv (%) 12.56)

Defoliación de las plantas de naranjilla por efecto de la aplicación de los tratamientos

El análisis de varianza para medir el efecto de la defoliación (Cuadro 4) a causa de la aplicación de los agroquímicos, detectó diferencias estadísticas entre tratamientos, productos, así como en la interacción productos con dosis y con los testigos. El Coeficiente de Variación fue de 13.2%, el promedio general de defoliación de las plantas con base a la escala arbitraria (1= no defoliación y 5 defoliación total de la planta) fue de 2.3

La defoliación de las plantas por efecto de la aplicación de los productos químicos (Cuadro 5) mostró que el testigo absoluto (T30) no presento plantas defoliadas, como se esperaba; mientras que los tratamientos T8, T12 y T29 fueron los que mayor afectaron a la planta debido a la alta defoliación presentada con 3.8, 3.9 y 4.2 respectivamente. La alta incidencia de los productos en la defoliación de las plantas afecto también en el rendimiento.

Cuadro 3. Promedios y prueba de tukey (5%) del número de frutos por inflorescencia de los 30 tratamientos en estudio, a los 20 d de aplicado los tratamientos

Tratamiento	Promedio	Rangos		
T26	4.15	c		
T24	4.33	c	b	
T6	4.63	c	b	
T23	4.63	c	b	
T9	4.74	c	b	
T28	4.78	c	b	
T3	4.91	c	b	
T2	4.93	c	b	
T16	4.94	c	b	
T27	5.22	c	b	A
T25	5.30	c	b	A
T19	5.30	c	b	A
T29	5.37	c	b	A
T22	5.44	c	b	A
T11	5.48	c	b	A
T17	5.57	c	b	a
T10	5.72	c	b	a
T5	5.78	c	b	a
T8	5.96	c	b	a

T18	6.04	c	b	a
T4	6.19	c	b	a
T1	6.28	c	b	a
T21	6.33	c	b	a
T7	6.41		b	a
T20	6.44		b	a
T30	7.19			a
T12	7.59			a

Cuadro 4. Análisis de varianza de la defoliación (escala arbitraria 1= sin defoliación y 5 completamente defoliada) de las plantas después de la aplicación de los tratamientos (defoliación promedio 2.3 y cv (%) 13.2)

F de V	GL	SC	CM
Total	80.00	79.03	
Tratamientos	26.00	73.49	2.83**
Productos	7.00	3.84	0.55**
dosis	2.00	1.62	0.81**
P x D	14.00	46.38	3.31**
Fact vs Testigos	2.00	15.99	7.99**
Repeticiones	2	0.54	0.27ns
E.E.	52.00	5.00	0.10

Cuadro 5**.** Promedios (escala) y prueba de tukey (5%) para defoliación de las plantas de naranjilla por efecto de los 30 tratamientos en estudio

Tratamientos	Promedio	Rangos
T30	1.39	a
T6	1.61	a b
T25	1.67	a b c
T10	1.78	a b c d
T2	1.94	a b c d
T23	2.00	a b c d
T28	2.00	a b c d
T3	2.11	a b c d
T9	2.11	a b c d
T11	2.11	a b c d
T17	2.28	a b c d e
T1	2.39	b c d e f
T5	2.44	b c d e f
T22	2.44	b c d e f
T16	2.50	b c d e f
T7	2.56	b c d e f g
T4	2.61	c d e f g h
T26	2.67	d e f g h
T19	2.72	d e f g h
T18	3.11	e f g h i
T24	3.33	f g h i j

T21	3.50		g	h	i	j
T27	3.56			h	i	j
T8	3.78				i	j
T12	3.89				i	j
T29	4.22					j

Diámetro del fruto

A los 45 días de haber aplicado los tratamientos se procedió a evaluar el diámetro de los frutos de naranjilla. El ADEVA (Cuadro 6) detecto diferencias estadísticas entre los tratamientos y dosis. También existieron deferencias estadísticas en las interacciones entre productos y dosis y entre los factores y los testigos. En el cuadro 7, se observa 7 rangos de significación. Los frutos provenientes de los tratamientos T 19, T29, T20 y T21, son los de mayor tamaño, ya que produjeron frutos con diámetro mayor a los 50 mm a los 45 d después de aplicar los tratamientos: por su parte el tratamiento T28 produce frutos con diámetro menor a la mitad de los anteriores. El T30 (testigo absoluto) estuvo dentro de los frutos más pequeños. Esto sugiere que existe la posibilidad de encontrar productos químicos que puedan remplazar al 2-4D, y que a su vez tienen menor fitotocixidad. La aplicación de productos químicos que reemplacen al 2-4D para mejorar el tamaño del fruto de naranjilla, se puede considerar una tecnología a corto plazo. Sin embargo, se está trabajando a través del mejoramiento genético para conseguir frutos grandes sin necesidad de aplicar agroquímicos y que tengan calidad del fruto que reúna los requerimientos del mercado, y de esta manera proteger la salud de productores, consumidores y también ayudar a preservar el ambiente.

Cuadro 6. Análisis de varianza del diámetro (mm) de los frutos de naranjilla, 45 días después de la aplicación de los tratamientos (promedio general 33 mm y cv 8.3%)

F de V	GL	SC	CM
Total	**89.00**	**16354.82**	
Tratamientos	29.00	15900.27	548.29**
Productos	8.00	14004.88	1750.61**
dosis	2.00	88.73	44.36**
P x D	16.00	271.45	16.97*
Factor vs Test	2.00	28117.14	14058.57**
Repeticiones	2	16.93	8.47ns
E.E.	58.00	437.62	7.55

Cuadro 7. Promedios y prueba de tukey (5%) del diámetro (mm) de los frutos de naranjilla 45 días después de aplicar los tratamientos en estudio

Tratamientos	Promedio	Rangos		
T28	25.74	g		
T5	27.34	g	f	
T27	27.35	g	f	
T6	27.61	g	f	e

T30	29.23	g	f	e	d			
T26	30.22	g	f	e	d	c		
T25	30.35	g	f	e	d	c		
T23	30.44	g	f	e	d	c		
T18	32.95	g	f	e	d	c	b	
T24	33.73	g	f	e	d	c	b	
T7	34.35	g	f	e	d	c	b	
T4	34.77		f	e	d	c	b	
T10	35.94		f	e	d	c	b	
T17	36.21			e	d	c	b	
T11	36.72				d	c	b	
T9	37.06				d	c	b	
T8	37.49				d	c	b	
T16	37.93				d	c	b	
T2	38.43					c	b	
T12	38.90					c	b	
T3	39.32						b	
T22	39.36						b	
T1	39.58						b	
T21	50.68							a
T20	50.69							a
T29	54.03							a
T19	55.28							a

2.2.8.4. Conclusiones

De los resultados obtenidos en campo, la "Naranjilla" (*Solanum quitoense)* Híbrido Puyo, presento respuestas variables al efecto de los tratamientos evaluados, en cuanto a crecimiento, desarrollo y producción.

El patrón que se utilizó para injertar la naranjilla fue muy tolerante a nemátodos, y *Fusarium oxysporum,* no así al ataque del barrenador del tallo.
Se detectaron diferencias en el número de flores por inflorescencia, a los 20 días después de la aplicación de los tratamientos. Se tuvo un promedio de 8.4 flores por inflorescencia

Los tratamientos t13, t14, t15, provocaron una caída total de las flores, a partir de la segunda aplicación (15 días después de la primera) por lo cual no se pudo continuar con su análisis.

Se detectó diferencias estadísticas entre productos y entre las dosis evaluadas a los 20 días de la aplicación.

De la información obtenida hasta el momento, se aprecia que los tratamiento T19, T20 y T21 son los que presentan una mejor apariencia en el fruto, el cual va ha ser verificado con otros análisis agronómicos y de laboratorio.

2.2.8.5. Bibliografía

CAÑADAS, L. 1993. El mapa Bioclimático y ecológico del Ecuador.
_____. Quito, MAG-PRONAREG

HEISER, C. 2000**.** Interespecific hybridization and improvement of the naranjilla (*Solanum quitoense*). Fifth International Solanaceae Conference.

_____. 1993**.** The naranjilla (*Solanum quitoense*) the cocona (*Solanum sessiliflorum*) and their hybrid. Gene Conservation and Explotation. Eds. Gustafson J.P. et. al. Plenum press. New York. pp. 29-34.

LUCIO, C. ESPÍN, M. 1997. Niveles residuales de plaguicidas en frutas Andinas Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea)* y naranjilla (*Solanum quitoense).* Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. PROCIANDINO. Quito. s.p.

REVELO, J; SANDOVAL, P. 2003. Factores que afectan la producción y productividad de la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en la región amazónica del Ecuador. Quito-Ecuador. p. 108

2.2.9. Evaluación de reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de naranjilla *(Solanum quitoense. híbrido puyo*). San Miguel de los Bancos- pichincha[25].

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

2.2.9.1. Objetivos

Objetivo General

- Evaluar los reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de Naranjilla (*Solanum quitoense*. Híbrido Puyo), que tengan baja residualidad y que puedan reemplazar el 2,4-D.

Objetivos Específicos

- Determinar el regulador orgánico de crecimiento más eficiente para el engrose del fruto de naranjilla.
- Determinar la dosis adecuada de los reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de naranjilla.
- Establecer el número de aplicaciones para el adecuado engrose del fruto de naranjilla.
- Realizar el análisis económico de los tratamientos en estudio.

2.2.9.2. Marco Referencial

La naranjilla es planta originaria de las estribaciones de los Andes del Ecuador y Colombia, perteneciente a la familia Solanácea. Posee una fruta de gran demanda

[25] J. Navarrete; P. Viteri; J. León; W. Vásquez.

a nivel nacional e internacional debido a su sabor agridulce, aromático y refrescante.

Es muy susceptible al ataque de enfermedades y plagas, lo que asociado a un bajo rendimiento, ha reducido drásticamente la superficie cultivada. En 1990 se identificó un híbrido natural denominado “Puyo” que resultó tolerante a las enfermedades y alivió parcialmente los problemas. Posee fruto de tamaño pequeño, por lo que se realizan aplicaciones de 2,4-D (Dacocida) para incrementar tamaño.Por su modo de acción, al 2,4-D, se le incluye dentro de los “herbicidas hormonales” pues actúa de modo parecido a la hormona natural auxina, o ácido indol-3-acético (AIA).

La liberación de alguna cantidad de dioxinas durante la producción de 2,4-D es inevitable. La dioxina es un compuesto orgánico incoloro e inodoro y extremadamente estable en la naturaleza; estudios han revelado que es cancerígena. Otros efectos que frecuentemente se mencionan incluyen desórdenes del comportamiento y el aprendizaje, respuesta inmune deprimida, bajo nivel de testosterona y espermatozoides, diabetes, y endometriosis.

Existe alta oferta de reguladores de crecimiento naturales y sintéticos para mejorar el tamaño de la fruta, estos generalmente contienen hormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas. La presente investigación, permitirá evaluar reguladores orgánicos de crecimiento que poseen pequeñas cantidades de hormonas y presentan porcentajes bajos de residualidad.

2.2.9.3. Metodología

Ubicación del ensayo

El ensayo se realizó en Pichincha, cantón San Miguel de los Bancos, parroquia San Miguel de los Bancos, comunidad Nuevo Mundo, a una altura de 827 msnm.
Se utilizaron plantas de naranjilla del Híbrido Puyo, injertadas en patrón resistente a Fusarium y nemátodos.

Factores en estudio

Productos (P). Los productos a utilizarse son Agromil Plus, Crezymax, Rooting, Maxigrow-Excel y Dacocida.

Dosis (D). Las dosis a utilizarse son la dosis recomendada por la casa comercial y otra dosis que es 50% más que la dosis recomendada.

Número de aplicaciones (A). Las aplicaciones a realizarse se las dividió en dos tipos: dos aplicaciones y tres aplicaciones en el ciclo de producción.

Unidad experimental.

La unidad experimental estará conformada por tres inflorescencias de una misma planta que estén en estado de floración (50% de flores abiertas aproximadamente), a este grupo de inflorescencias se les realizará tres aplicaciones (tratamientos pares). Para los tratamientos que poseen dos aplicaciones, se seleccionarán 20 días después tres inflorescencias que posean el 50% de flores abiertas, esto en la misma planta; de tal forma, que en una sola planta se tenga dos unidades experimentales en la que realizarán aplicaciones del mismo producto, misma dosis, pero diferente número de aplicaciones.

Análisis estadístico.

Diseño Experimental. Diseño de Bloques Completos al Azar (D.B.C.A.) en arreglo grupal con un total de 19 tratamientos con cinco repeticiones.

Variables y métodos de evaluación:

Número de flores por inflorescencia. En una planta, se seleccionaron al azar tres inflorescencias que posean el 50% de flores abiertas.

Porcentaje de fructificación. Se obtuvo el porcentaje de frutos cuajados por inflorescencia y se obtendrá el promedio por planta y por tratamiento.

Días a la Cosecha. En las Inflorescencias seleccionadas, se determinaron los días que transcurrieron desde la plena floración hasta que los primeros frutos tengan 70% color amarillo y 30% color verde y se realice la cosecha.

Número de Frutos cosechados. De todas las inflorescencias seleccionadas, se contabilizó el número de frutos cosechados.

Diámetro de los frutos cosechados. De lo frutos cosechados se midió el diámetro ecuatorial de los mismos.

Rendimiento. Con base a índices de número de flores por rama y ramas por planta, se estimó un rendimiento aproximado de cada tratamiento. Esta variable se expresará en kilogramos por planta y en TM/ha.

Calidad. Se seleccionaron en el momento de la cosecha al azar cinco frutos por tratamiento.

Evaluación de la residualidad. Se enviaron muestras de los frutos de los tratamientos que presente significación estadística al laboratorio.

Daño provocado por los productos. Luego de la aplicación de los productos, se describieron los daños causados a los diferentes órganos de la planta, además se considerará el porcentaje de daño.

Análisis económico. Se realizará el análisis de Presupuesto parcial de acuerdo al CIMMYT (1988).

2.2.9.4. Resultados y Discusión

El tratamiento con mejor cuajamiento de frutos fue el t10 (Rooting con tres aplicaciones y dosis de 1,5 ml/l) con 18,6 frutos por planta; mientras que el tratamiento con menor número de frutos fue el t18 (Dacocida con tres aplicaciones y dosis de 1 gota/litro) con 10 frutos por planta.

El producto con mejor cuajamiento de frutos fue el Rooting con 16,67 frutos por planta; el producto con menor número de frutos fue el Dacocida con 10,67 frutos por planta.

El número de aplicaciones con mejor cuajamiento de frutos fue con DOS aplicaciones con 14,44 frutos por planta; el menor número de frutos fue con TRES aplicaciones con 14,24 frutos por planta.

La dosis con mejor cuajamiento de frutos fue la dosis con más 50% de lo recomendado con 14,89 frutos por planta; mientras que la dosis con número menor de frutos fue la dosis recomendada con 14,71 frutos por planta.

El tratamiento que posee frutos de mayor diámetro fue el t18 (Dacocida con tres aplicaciones y dosis de 1 gota/litro) con frutos de 53,93 mm. de diámetro; el tratamiento con menor diámetro de frutos fue el t19 (Testigo absoluto, sin aplicación) con frutos de 36,57 mm. El producto que promovió frutos de mayor diámetro fue el Dacocida con frutos de 51,31 mm. de diámetro; el menor diámetro fue obtenido con el Crezymax, frutos de 43,40 mm. de diámetro.

El número de aplicaciones que dio frutos de mayor diámetro fue TRES aplicaciones con frutos de 47,29 mm. de diámetro; con DOS aplicaciones se obtuvieron frutos de 45,20 mm. de diámetro.

La dosis que produjo frutos de mayor diámetro la dosis 50% más de lo recomendado con frutos de 46,36 mm. de diámetro; y de menor diámetro la dosis recomendada con 44,89 mm.

El tratamiento con mejor rendimiento fue el t16 (Maxigrow Excel + Citokin con tres aplicaciones y a dosis de 3,75ml/l y 1 ml/l respectivamente) con 0,870 kg/planta (2,18 TM/ha por cosecha); mientras que el tratamiento con menor rendimiento fue el t19 (Testigo absoluto, sin aplicación) con 0,284 kg/planta (0,71 TM/ha por cosecha). El producto con mejor rendimiento fue el Maxigrow con 0,715 kg/planta (1,79 TM/ha por cosecha); el producto con menor rendimiento fue el Crezymax con 0,610 kg/planta (1,53 TM/ha por cosecha).

El número de aplicaciones con mejor rendimiento fue con dos aplicaciones con 0,690 kg/planta (1,73 TM/ha por cosecha); el menor es con TRES aplicaciones

con 0,671 kg/planta (1,68 TM/ha por cosecha). La dosis con mejor rendimiento fue la dosis con más 50% de lo recomendado con 0,692 kg/planta (1,73 TM/ha por cosecha); mientras que la dosis menor rendimiento es la dosis recomendada con 0,672 kg/planta (1,68 TM/ha por cosecha).

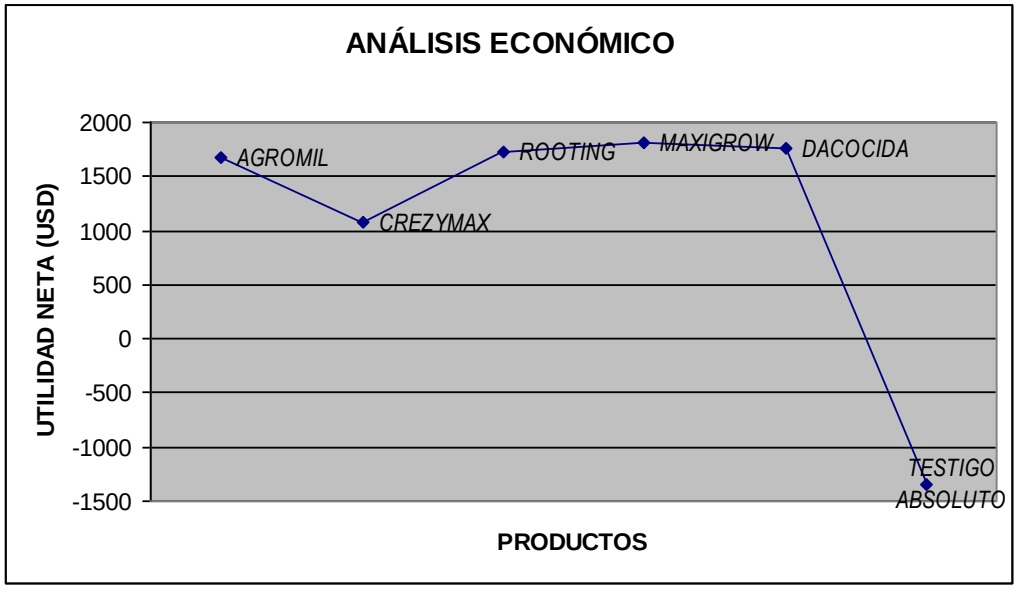
El tratamiento que posee frutos de mejor calidad fue el t14 (Maxigrow Excel con tres aplicaciones y a dosis de 2,5 ml/l) con frutos de 9,06º Brix; el tratamiento con menor calidad fue el t19 (Testigo absoluto, sin aplicación) con frutos con frutos de 7,16º Brix.

El producto que promovió frutos de mejor calidad fue el Dacocida con frutos de 8,72º Brix; la menor calidad fue obtenida con el Rooting con frutos de 7,95º Brix. El número de aplicaciones que dio frutos mejor calidad fue TRES aplicaciones con frutos de 8,59º Brix; con DOS aplicaciones se obtuvieron frutos de 8,04º Brix.

La dosis que produjo frutos de mejor calidad fue la dosis 50% más de lo recomendado con frutos de 8,45º Brix; y de menor calidad la dosis recomendada con 8,23º Brix

Análisis económico.

Gráfico 1. Utilidad neta de la producción en un año de una hectárea de naranjilla Híbrido Puyo (*Solanum sessiliflorum x S. quitoense*). San Miguel de los Bancos, Pichincha. 2010.



2.2.9.5. Conclusiones

Utilizar Maxigrow Excel en una dosis de 3,75 ml/l junto a 1 ml/l de citokin en el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense* var. Híbrido Puyo) en tres aplicaciones (en flor, cuajado y engrose) incrementará el porcentaje de fructificación así como el tamaño y peso del fruto, con el respectivo aumento del rendimiento.

La dosis de reguladores orgánicos de crecimiento que tiene mejor efecto en el tamaño del fruto fue la dosis de 50% más de lo recomendado por la casa comercial.

En general, los reguladores de crecimiento obtienen un buen desempeño con DOS aplicaciones (flor y cuajado del fruto).

El producto que tiene mejor rendimiento económico fue el Maxigrow Excel.

2.2.9.6. Bibliografía

ASOCAE. Nauraleza educativa. 2010. Botánica, Taxonomía vegetal. España. Asociación Española para la Cultura, el Arte y la Educación. Consultado 1 junio 2010. Disponible en ttp://www.natureduca.com/botan_indice_clasif1.php#inicio

BEAULIEU, R; y otros. 1973. Reguladores de crecimiento. Traducido por Rosendo Castells. Barcelona, España. 245 p.

CUEVA, G. 2003. Determinación de residuos del pesticida 2,4-Diclorofenoxi-acético (2,4-D) en naranjilla (*Solanum quitoense*) por cromatografía de gases. Tesis Licenciatura en Ciencias Químicas especialidad Química Analítica. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 65 p.

GARCÉS, J. 1992. El cultivo del lulo. Publicación técnica Nº 12. Medellín, Colombia. Secretaría de Agricultura de Antioquia.

WEAVER, R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Primera edición. México, Editorial Trillas. 622 p.

2.2.10. Prospección de enemigos naturales del barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis* (guenée)) de la naranjilla (*Solanum quitoense*) y evaluación de la incidencia de las plagas en su cultivo[26].

Objetivo del Proyecto (3): "*Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.2.10.1. Objetivos

- Determinar la presencia de enemigos naturales del barrenador del fruto (*N. elegantalis*) en naranjilla (*S. quitoense*).
- Establecer la incidencia de las principales plagas que atacan al cultivo.
- Identificar los enemigos naturales (entomopatógenos y parasitoides), más importantes de *N. elegantalis*, en las principales zonas productoras del país.
- Reconocer el grado de importancia de los diferentes insectos plaga que afectan al cultivo de naranjilla en las principales zonas productoras del país.

[26] Cristina Sosa; Patricio Gallegos, William Viera

2.2.10.2. Marco Referencial

La “Naranjilla” (*Solanum quitoense*) es un cultivo importante en las estribaciones oriental y occidental de los Andes del Ecuador (13). El “Barrenador del fruto” (*Neoleucinodes elegantalis*) es el insecto plaga más significativo en este cultivo y el que causa mayores pérdidas económicas, llegando a afectar al 90 % de la producción (6 14), encontrándose en todos los lugares donde se cultiva, por tanto los pequeños agricultores requieren de métodos de control para reducir el daño causado por la plaga. La fruta de acuerdo a estudios realizados, presenta residuos tóxicos no admisibles, además se debe indicar el riesgo de contaminación que representa para los agricultores al momento de aplicar pesticidas a la planta, para el medio ambiente y para los consumidores. Es muy valiosa una prospección o búsqueda de enemigos benéficos para aprovechar el control que realizan en condiciones naturales. Sin embargo hasta ahora no se ha realizado una exploración sistemática de los enemigos naturales de *N. elegantalis*. Por otra parte la naranjilla es atacada por diferentes plagas en las distintas partes de la planta, insectos que varían dependiendo de la zona, por ello es importante también determinar cuáles son los de mayor relevancia y que grado de incidencia tienen en el cultivo, para trabajos futuros sobre su control.

2.2.10.3. Metodología

En el primer estudio se realizaron recolecciones en localidades de las provincias de Pichincha, Tungurahua, Pastaza y Napo, se realizaron cuatro muestreos dirigidos. A las plantas de naranjilla seleccionadas se les tomó cinco flores, todos los frutos afectados y hojarasca de ramas bajeras o del suelo (39). Los muestreos se tomaron durante ocho meses, de Diciembre a Julio.

En laboratorio se analizaron flores, frutos y hojarasca en búsqueda de huevos, larvas y pupas de *N. elegantalis*, respectivamente. La mayoría de especímenes encontrados no presentaron sintomatología al momento de su examinación. Se determinó que los especímenes estaban afectados por hongos principalmente por la formación de micelio, con bacterias cuando despedía un olor fétido, con virus cuando se observó cuerpos endurecidos, cambios de color repentino, color lechoso; con parasitoides: abultaciones en el insecto. Los hongos fueron aislados y sembrados en el medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), se los purificó y finalmente se los identificó con la ayuda del manual de BARNNET. Las bacterias fueron aisladas y sembradas en el medio de cultivo agar nutritivo 69; igualmente se realizaron purificaciones hasta obtener cultivos puros. El estudio de bacterias se dirigió a la familia Bacillaceae, por ser una familia con amplias posibilidades de usarse en control biológico. Se las tiñó y se seleccionaron las gram positivas, luego se observó al microscopio y nuevamente se tomaron solo las que tenían forma de bacilos, finalmente se hizo una prueba de formación de endósporas. Con las cepas seleccionadas se procedió a la identificación de especie, se usó la galería api 50CH y el software api web. En los virus se usaron geles de poliacrilamida para determinar su presencia y el peso molecular de la cápside. Se realizó también estudios del ácido nucleíco viral siendo: extracción, electroforesis

en gel de agarosa y una amplificación del ADN mediante el método del círculo rodante. Los parasitoides se observaron en cámaras de cría y cuando emergieron se los montó o se los conservó en alcohol. Las variables fueron: porcentaje de parasitismo para parasitoides y porcentaje de infección para hongos, bacterias y virus.

En el segundo estudio se muestreó en localidades representativas de las principales zonas productoras de naranjilla en el Ecuador. Se hicieron dos muestreos dirigidos secuenciales. Se usaron diferentes variables para la determinación de la incidencia de los diferentes insectos a evaluar y fueron: porcentaje de frutos dañados para "Barrenador del fruto" (*N. elegantalis*), porcentaje de plantas dañadas para "Barrenador del tallo", porcentaje de ramas dañadas para "Barrenador de las ramas", porcentaje de flores dañadas para "Perforador de las flores", porcentaje de brotes afectados para "Áfidos", porcentaje de área defoliada para "defoliadores".
En los dos estudios se usó un análisis estadístico no paramétrico mediante la distribución de frecuencia, tanto por ciento, promedio, cuadros comparativos y gráficos.

2.2.10.4. Resultados y Discusión

ESTUDIO 1: PROSPECCIÓN DE ENEMIGOS NATURALES (HONGOS, BACTERIAS, VIRUS, PARASITOIDES) DEL BARRENADOR DE LA NARANJILLA (*Neoleucinodes elegantalis*) EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DEL PAÍS[27].

En la prospección que se llevó a cabo se encontró todos los estados del barrenador del fruto; sin embargo, el estado larval fue en el que se recolectó el mayor número de especímenes. Dado que las larvas son las que provocan el daño visible, y el muestreo fue dirigido a plantas sintomáticas, el mayor número de especímenes recolectados fue en este estado. En los pocos huevos recolectados no se encontró parasitoides, ni entomopatógenos. El número de pupas halladas fue reducido, sin embargo, en estas se encontraron parasitoides.

Análisis general del ataque de enemigos naturales por estado

Larvas

Se observa que un 10.19 % de las larvas recolectadas en campo fueron afectadas por diferentes enemigos naturales como hongos, bacterias, virus y parasitoides. Si se compara este porcentaje de ataque larval con otras prospecciones se observa que es relativamente bajo ya que en estudios
realizados por 47 en búsqueda de enemigos naturales de *N. elegantalis* se encontraron solo parasitoides que alcanzaron un porcentaje de control natural de hasta 22 %; sin embargo, se debe mencionar que es importante el hallazgo de

[27] Sosa Maria Cristina

estos benéficos a pesar del manejo tradicional que este cultivo que usa una gran cantidad de agroquímicos, y se abre la puerta para emplear nuevas estrategias basadas en el control biológico, o a su vez potencializar el control natural existente en campo, mediante técnicas como recuperación de parasitoides, o mediante el incremento y liberación de microorganismos.

Los virus son los enemigos naturales que mostraron un mayor ataque al estado larvario con un 7.47 % en relación al total de larvas recolectadas en campo; lo cual constituyó 73.33 % del total de larvas afectadas por enemigos naturales. La transmisión de los virus se puede dar por parasitoides, adultos contaminados, predadores, agua, lluvia o transmisión transovariana (dentro del óvulo), y transovigénica (cuando la superficie de la oviposición está contaminada) (4). Sin embargo, la forma más común de transmisión es a través del consumo del alimento contaminado y es probablemente así que se contaminaron varias de las larvas infectadas por virus. Las diferentes formas de transmisión del virus pueden ser razones para que haya existido un ataque viral elevado, comparado con los otros controladores.

Los hongos constituyen el enemigo natural que afectó en menor grado al estado larval, con un 0.57 % respecto del total de larvas recolectadas, y un 5.56 % en relación al ataque total de enemigos naturales en este estado. Su baja presencia podría estar relacionada a que los hongos generalmente atacan cuando encuentran insectos expuestos, y como se mencionó la larva se encuentra dentro del fruto, de tal modo que su ocurrencia tiene pocas probabilidades de darse.

Las bacterias presentan un 0.79 % de ataque en relación a las 883 larvas recolectadas, y un 7.78 % respecto del total de especímenes larvales atacados por enemigos naturales.

Los parasitoides presentan un 1.36 % de control en relación a las 883 larvas recolectadas, lo que representa un 13.33 % en relación al ataque total de enemigos naturales.

Es de vital importancia para el empleo de estos organismos como agentes de control biológico realizar investigaciones sobre la biología y comportamiento de cada uno, así como comprobar que los biocontroladores encontrados son inocuos a la fauna benéfica presente en el cultivo de naranjilla.

Pupas

Los parasitoides son los únicos enemigos naturales que atacan a las pupas de *N. elegantalis*. Entre tanto podemos ver que los parasitoides constituyen en condiciones de campo la principal estrategia de control natural de pupas del barrenador.

Análisis por enemigo natural

Hongos

Se procesaron los especímenes que presentaron sintomatología causada por un hongo entomopatógeno. No obstante un gran número de los hongos aislados resultaron ser saprofíticos. Los hongos encontrados fueron: *Fusarium* sp. y *Phialophora* sp. Además, en algunos aislamientos se tuvieron problemas con contaminantes como: *Penicilliium* sp. y *Rizophus* sp. Se observa que el hongo *Beauveria* sp. presenta un porcentaje de infección de 0.23 % respecto a las 883 larvas recolectadas; y un 40.00% en relación al número total de larvas afectadas por hongos. *Beauveria* sp. es un entomopatógeno con una amplia patogenicidad; así se lo ha encontrado en más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes. Cabe recalcar que en la Colección de Hongos Entomopatógenos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos se reportó su presencia infectando a larvas de *Galleria mellonella* que es una especie de la misma familia que *N. elegantalis*; lo cual da una perspectiva de la viabilidad del uso de este hongo entomopatógeno para el control del "Barredor del fruto de la naranjilla".

Beauveria sp. se ha encontrado en anteriores estudios de prospecciones de hongos entomopatógenos en "Gusano blanco" (*Premnotripex vorax*) en el cultivo de papa en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo y Carchi (9); en el "Aguacuro del maíz" (*Macrodactylus pulchripes*) en San José de Minas –Pichincha (40); y en *Cosmopolites sordidus* y *Metamasius hemipterus* en Galápagos (46) en investigaciones realizadas por INIAP. En estos insectos plaga se probó su patogenicidad y viabilidad para usarse en condiciones de campo. Los resultados obtenidos dan expectativas alentadoras para usarlo como un biocontrolador de *N. elegantalis.*

Aspergillus sp. presentó un porcentaje de infección de 0.23 % en relación al total de larvas colectadas y un 40.00 % respecto al número total de larvas afectadas por hongos. Este organismo generalmente se encuentra como patógeno secundario en un proceso de infección, ya que su ocurrencia en la mayoría de los casos se ha reportado en insectos moribundos ya colonizados por otros patógenos o sometidos a diferentes tipos de estrés en condiciones de laboratorio y campo. Sin embargo en diferentes estudios, se ha usado a esta especie para controlar larvas de lepidópteros y saltamontes; y se ha encontrado que los insectos mueren antes de empupar (4). Por ello, es importante probar la patogenicidad que podría presentar este organismo.

Verticillium sp. alcanzó un porcentaje de infección de 0.11 % del total de larvas colectadas, constituyendo el 20.00 % en relación al número de larvas atacadas por hongos. Este organismo se ha usado generalmente para el control de áfidos, obteniéndose resultados exitosos. Sin embargo, a pesar de haber sido reportado atacando a larvas *Tecia solanivora* (Lepidóptera) (34), existe poca información de *Verticillium* sp. como controlador de insectos correspondientes al orden taxonómico mencionado. Todos los hongos citados con excepción de una cepa de

Beauveria sp. encontrada en Río Negro, Tungurahua (TBRN); se hallaron en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA); mostrándose ésta como una área potencial para la búsqueda de hongos entomopatógenos.

Bacterias

Se procesó en cámara húmeda muchos especímenes con sintomatología de una posible bacteria, obteniéndose varios aislamientos; luego se los purificó estriándolos hasta obtener cultivos puros y se hicieron las diferentes pruebas para encontrar bacterias de la familia Bacillaceae. Se procesaron 49 posibles bacterias según la metodología citada para la determinación de esta familia, de donde se seleccionaron seis cepas pertenecientes a la familia Bacillaceae. Todos los especímenes que mostraron un ataque de bacterias fueron larvas.

La bacteria que presentó el mayor porcentaje de infección en larvas fue *Bacillus cereus*, con un 0.68 % de infección de 883 larvas colectadas y un 85.71 % en relación al número total de larvas atacadas por bacterias. Este entomopatógeno afecta a algunas especies de lepidópteros (4) y en el presente estudio es predominante en relación al total de especímenes afectados por bacterias. De los seis especímenes larvales atacados por *Bacillus cereus*, cinco fueron encontrados en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA). Notándose a esta área como importante al presentar un control bacteriano natural.

Paenibacillus polymyxa, presentó un porcentaje de infección de 0.11 % de las 883 larvas colectadas y un 14.29 % en relación a las 7 larvas afectadas por bacterias. Ésta bacteria se la ha usado por mucho tiempo como un biopotencializador de la rizósfera del suelo para la fijación de nitrógeno; y como antagónico de ciertos hongos, también se la ha reportado en asociación con nemátodos entomopatógenos, pero muy poco es lo que se ha dicho de su patogenicidad a insectos (5), sin embargo es interesante la presencia de ésta bacteria, ya que, al ser un tanto desconocida en este ámbito nos abre la puerta para descubrir su eficiencia como controlador de insectos. Las bacterias por su alta tasa de reproducción y no tanta exigencia en relación a condiciones climáticas como los hongos, se los ve como agentes potenciales para el control de plagas, en este caso de *N. elegantalis*.

Todos los especímenes afectados por virus se presentaron en el estado larval, a pesar de que la mayoría de éstos fueron procesados en el laboratorio en estado de pupa se considera que el ataque fue larval porque éste fue el estado en el que se las recolectó en campo. Antes de establecer la presencia de éstos virus en larvas de *N. elegantalis*, se constató que los patrones proteicos encontrados no estaban presenten en larvas sanas; por tanto, se atribuyó la presencia de los dos virus hallados en los especímenes larvales analizados.

Se observa al primer virus NeelV1 con una sola proteína mayor de un peso molecular de 83.35 ± 1.61 kDa presentó en un 5.55 % de infección en 883 larvas colectadas siendo éste predominante con 74.24 % en relación al total de larvas

afectadas con virus. Este enemigo natural es el que presentó el porcentaje más alto de ataque a *N. elegantalis*, mostrándose con altas posibilidades de usarse como un posible biocontrolador de este insecto. Cabe recalcar que éste virus se presentó en casi el cien por ciento de las localidades muestreadas, siendo más frecuente en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA).

El segundo virus NeelV2 con dos proteínas mayores con un peso molecular de 86.83 ± 1.55 y 77.53± 2.59 kDa se presentó en un 1.93 % de las 883 larvas colectadas y en 25.76 % en relación a las 66 larvas afectadas por virus. La distribución geográfica al igual que el otro virus es amplia hallándose en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Pastaza y Napo, su presencia más frecuente se muestra en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA).

Electroforesis de la proteína viral (determinación del peso molecular)

Se determinó la presencia de dos virus: el primero (NeelV1) presenta una proteína de 83.35 ± 1.61 kDa y el segundo (NeelV2) presenta dos proteínas virales de 86.83 ± 1.55, 77.53± 2.59 kDa corridos en el gel SDS PAGE. Los dos virus presentes podrían corresponder a un mismo virus; esta hipótesis se plantea ya que los pesos moleculares de los dos virus fueron similares y podría ser que por condiciones de almacenamiento y degradación ciertas proteínas virales se destruyeron parcialmente, generando un patrón proteico levemente distinto.

Centrifugación sobre Gradientes de densidad de iodixanol

Después de centrifugada la muestra se observaron diferentes bandas, distinguidas por su peso molecular; entre las cuales se pudo distinguir el virus por ciertas características típicas que indican su presencia. Se comprobó que se trataba del virus, extrayendo la capa y pasándola en geles de poliacrilamida y se comprobó la presencia del patrón proteico atribuido al virus.

Electroforesis en gel de agarosa del ácido nucleíco viral

El virus NeelV1 es un virus de ADN lineal simple y cadena circular, con un peso molecular de 4.2 kb o 4200 bpd. Se comprobó su presencia al usar el kit TempliPhi (Amersham Biosciences) y realizar un corte con la enzima de restricción EcoRV. El virus encontrado no se lo pudo ubicar dentro de ninguna familia conocida por las características que presenta; sin embargo un virus de ADN de simple cadena circular similar se ha encontrado atacando a *Tecia solanivora* (Lepidóptera).

Parasitoides

Los parasitoides *Meteorus* sp., *Lymeon* sp., y un Ichneumonidae presentaron un 4.76 % de parasitismo cada uno con respecto a 21 pupas recolectadas y un 33.33 % en relación al número total de pupas afectadas por parasitoides.

Todos los parasitoides que emergieron de pupas se encontraron en una misma localidad, San Francisco, Pichincha (PPVSF). De un total de cinco pupas recogidas en esta localidad, tres resultaron parasitadas, notándose un alto parasitismo de pupas en esta zona.
Debe recalcarse que esta zona maneja una aplicación de agroquímicos controlada, por ello se presume que se pudo hallar parasitoides. El manejo convencional basado en altas aplicaciones de agroquímicos no permitió encontrar enemigos naturales como parasitoides que se ven expuestos directamente a aplicaciones de plaguicidas.

Copidosoma sp. fue el único parasitoide que emergió de larvas y presentó un porcentaje de parasitismo de 1.36 %, de 883 larvas colectadas. Este Encyrtidae es una especie que parasita los huevos, pero los síntomas y signos del parasitismo se manifestaron en estado de larva, comúnmente conocida como momia (47).

Parasitoides de pupa

 ***Meteorus* sp. (Braconidae, Meteorinae)**

Este insecto mostró un porcentaje de parasitismo de 4.76 % de las 21 pupas colectadas. *Meteorus* sp., es un endoparásito común de larvas de macrolepidópteros, Además, como en algunas especies de la familia Noctuidae presentó superparasitismo en la que existen algunos agujeros de salida de los diferentes especímenes de este parasitoide que emergieron de la pupa de *N. elegantalis.*

 ***Lymeon* sp. (Ichneumonidae, Cryptinae)**

Esta avispa mostró un porcentaje de parasitismo de 4.76 % de las 21 pupas colectadas, y se trata de un hymenóptero que empezó su emergencia en estado de prepupa de *N. elegantalis*.

 Ichneumonidae

Esta avispa, al igual que las anteriores, presentó un porcentaje de parasitismo de 4.76 %, es un macrohymenóptero que emergió en estado de adulto de la pupa de *N. elegantalis*.

Parasitoide de larvas

 ***Copidosoma sp.* (Encyrtidae)** Se lo halló en las localidades de Río Negro, Tungurahua (TBRN) y Pindo Mirador, Pastaza (PMPM). Este insecto presenta poliembrionía; es decir que de un solo huevo se pueden originar de 100 a 200 individuos de *Copidosoma* sp. Esta característica hace a este parasitoide muy interesante, ya que de cada huevo depositado por una avispa hay el 50 % de posibilidades de encontrar hembras, por tanto, por cada huevo habrían de 50 a 100 nuevas avispas de *Copidosoma* sp.; hembras que ejercerán control natural

sobre *N. elegantalis* (47). Esta avispa presenta una alta especificidad, ya que en pruebas realizadas por VIÁFARA (47), no se pudo criar a este parasitoide al no ser posible la multiplicación en laboratorio de *N. elegantalis.* Se probaron otros hospederos que también son parasitados por diferentes especies de *Copidosoma* sp.; pero no se tuvo éxito. Al ser difícil la cría de este parasitoide en laboratorio una alternativa es la recuperación de parasitoides mediante muestreos en zonas identificadas como potenciales y la recuperación de los mismos para su liberación en campo.

Sintomatología de las larvas

A pesar de que la emergencia de *Copidosoma* sp. se da cuando el huésped alcanza su estado larvario, el parasitismo se inicia en los huevos. Las larvas de *N.elegantalis* de los últimos instares (cuarto o quinto) tuvieron un tamaño más grande al que habitualmente alcanzan en su último instar larvario. Al poco tiempo, la piel de la larva de *N. elegantalis* se tornó transparente y se observaron formaciones como arroces a través de la piel del huésped, que corresponden a cada individuo de *Copidosoma* sp.

Análisis por localidades

Análisis del ataque en larvas

En la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA), se presentó la mayor cantidad de enemigos naturales con un 3.17 % del porcentaje total de ataque de hongos, bacterias, virus y ausencia de parasitoides. En esta zona también se observó que el valor más alto de control de larvas de *N. elegantalis*, fue ocasionado por los virus con un 2.15 % de porcentaje de infección. La zona de Río Negro, Tungurahua (TBRN), presentó ataque de todos los enemigos naturales (hongos, bacterias, virus y parasitoides) a pesar de que los porcentajes de infección de los hongos y bacterias fueron muy bajos, 0.11 %. Es importante recalcar que en esta zona existe una amplia diversidad y potencialidad de biocontroladores.

Localidades como Saloya, Pichincha (PBSal) y El Esfuerzo 1, Pastaza (PPEE), no presentaron control de enemigos naturales. Esta ausencia total debe estar relacionada con el manejo convencional, basado en frecuentes aplicaciones de agroquímicos que combaten o frenan la acción de estos controladores biológicos.

Los virus como se citó anteriormente, presentaron una amplia distribución geográfica, ya que se presentaron en la mayoría de las áreas muestreadas; así se presentaron en las localidades: San Antonio, Pichincha; Marinitas, Pichincha; San Francisco 1, Pichincha; Río Negro, Tungurahua; Pindo Mirador, Pastaza; San Juan de Piatúa, Pastaza; San Francisco 2, Pastaza y Mondayacu, Napo.

En las localidades Río Negro, Tungurahua (TBRN) y Pindo Mirador, Pastaza (PMPM) se encontró al parasitoide *Copidosoma* sp. Según estudios realizados en Colombia (31, 47), la producción en laboratorio de este parasitoide no es viable,

por tanto se plantea como alternativa la potencialización del mismo, recuperándolo de larvas de *N. elegantalis* afectadas en campo; y así permitir el incremento de su población.

Análisis del ataque en pupas

La localidad San Francisco 1, Pichincha (PPVSF) es la única área donde se observó ataque de parasitoides a pupas. En esta localidad se presentó el 14.29 % de parasitismo en pupas de *N. elegantalis*; por tanto, es una zona potencial para futuros estudios de parasitismo de este insecto plaga; como también podría ser para la potencialización de los mismos. El manejo del cultivo en esta área consiste del uso de diferentes herramientas de control integrado de plagas y enfermedades; por esta razón se presume existe una alta biodiversidad de parasitoides.

ESTUDIO 2: EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE PLAGAS EN EL CULTIVO DE NARANJILLA EN LAS PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DEL PAÍS.

Los sitios donde se realizó la evaluación fueron zonas representativas. También se recolectaron otros insectos que al momento de la realización de este estudio, se encontraron causando daño al cultivo de naranjilla, siendo estos los siguientes:

Barrenadores de tallo y ramas: se evidenció la presencia de larvas de lepidópteros, barrenando tallos y ramas de naranjilla.

Perforador de la flor: se colectó a un posible *Colaspis* sp. – Coleóptero (determinado por comparaciones con la colección del INIAP), en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA).

Defoliadores: en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA), se recolectó a un posible *Epilachna* sp. Se determinó ésta especie por comparación con la colección del INIAP, donde se reporta que este insecto se encontró en el cultivo de naranjilla.

También se recolectó a un coleóptero que por comparaciones con la colección de INIAP tiene similitudes a *Pantomorus* sp. y a *Naupactus* sp. Este insecto defoliador también se encontró en la localidad San Antonio, Pichincha (PMSA).

Según bibliografía se ha encontrado a las especies de áfidos *Aphis* sp. y *Mizuz* sp. atacando al cultivo de naranjilla, sin embargo en el estudio solo se constató que pertenecen a la familia Aphididae.

Es de mucha importancia que se hagan recolecciones periódicas de los insectos plaga del cultivo de naranjilla, ya que por el manejo excesivo de agroquímicos, posiblemente muchos insectos que hoy no constituyen un problema en el futuro se podrían convertir en plagas.

Análisis por localidades

San Antonio (PMSA)

El “Barrenador del tallo” presentó mayor incidencia en esta zona, con un porcentaje de plantas dañadas del 25 %. La presencia de este insecto en la cuarta parte de las plantas, hace que se lo considere como un insecto que puede causar graves daños. Los “Áfidos” presentaron la menor incidencia alcanzando un valor de 2.08 % de brotes afectados. El perforador de las flores obtuvo un 17.13 % de inflorescencias dañadas y el “Barrenador del fruto” *N. elegantalis*, presentó un 15.42 % de frutos dañados, valores que se los considera de importancia en este cultivo. Los “Defoliadores” presentaron una baja incidencia con un porcentaje de defoliación de 1 al 5 %, no siendo un daño representativo en la naranjilla.

Marianitas (PQMar)

En esta localidad, el “Barrenador del fruto” *N. elegantalis* alcanzó una mayor incidencia, con un porcentaje de frutos dañados del 27.33 %; mientras que los “Áfidos” no se presentaron en esta área. La ausencia total de “Áfidos” puede estar relacionada con las condiciones climáticas de esta zona que es muy húmeda. El “Barrenadores del tallo alcanzó un 16.67 % de plantas dañadas, observando que su presencia podría llegar a ser un problema en éste cultivo. El “Barrenador de las ramas” alcanzó un 4.17 % de ramas dañadas y el “Perforador de las flores” logró un 6.25 % de inflorescencias dañadas; valores que muestran que la incidencia de estas plagas se presentó en menor grado. Cabe mencionar que los “Defoliadores” con un porcentaje de daño que va desde 1 a 5 % no constituyen un problema como insecto plaga.

Saloya (PBSal)

Se observa que el insecto plaga de mayor incidencia fue el “Barrenador del fruto” *N. elegantalis* alcanzando un 2.5 % de frutos dañados; mientras que los insectos plaga “Barrenador del tallo”, “Barrenador de las ramas”, “Perforador del fruto” y “Áfidos”, no se presentaron en esta localidad. A pesar de que hay presencia de *N. elegantalis*, éste insecto no fue de importancia ya que el daño que causa en el cultivo es mínimo. De igual forma, los “defoliadores” presentaron un porcentaje de incidencia de 1 a 5 %, que no es de importancia en el cultivo. Esta localidad presentó muy baja incidencia de insectos plaga debido principalmente al uso intensivo de agroquímicos.

San Francisco 1 (PPVSF)

El insecto plaga que presentó mayor incidencia fue el “Barrenador del fruto” *N.elegantalis* alcanzando un 14.29 % de frutos dañados; mientras que el “Barrenador del tallo”, “Perforador de las flores” y “Áfidos” no se presentaron en la zona. El “Barrenador de las ramas” llegó a una incidencia de 9.26 % de ramas afectadas. Los “Defoliadores” se presentaron con un porcentaje de daño 1 a 5 %

de área defoliada, siendo éste no significativo, ni de importancia económica en el cultivo.

Río Negro (TBRN)

Se observa que el "Barrenador de las ramas" constituyó el insecto plaga que alcanzó la mayor incidencia con un 25 % de ramas dañadas; mientras que, los "Áfidos" presentaron el menor porcentaje de daño, llegando a un 3.27 % de brotes afectados. Sin embargo, se puede notar que los insectos plaga "Perforador de las flores" y "Defoliadores" mostraron porcentajes de daño bajos que llegaron a 4.00 y de 1 a 5 % respectivamente; siendo éstos no significativos en el cultivo de naranjilla. Mientras que, el "Barrenador del fruto" *N. elegantalis* alcanzó una incidencia de 13.42 % de frutos dañados y el "Barrenador del tallo" logró una presencia de 10% de ramas dañadas.

El Esfuerzo 1 (PPEE)

El "Perforador de las flores" exhibió el porcentaje más alto de daño alcanzando un 33.22 % de inflorescencias dañadas, mientras que el "Barrenador del fruto" *N.elegantalis* no se presentó en ésta zona. La ausencia de daño puede deberse al control químico que se realiza. El insecto plaga "Barrenador del tallo", logró una incidencia de 16.67 % de plantas dañadas que se lo considera importante; mientras que el "Barrenador de las ramas "alcanzó un 6.67 % de ramas dañadas. La presencia de los insectos plaga: "Áfidos" con un 2.78 % de brotes afectados y "Defoliadores" con un porcentaje de defoliación de 1 a 5 % no representan problemas de importancia en esta zona.

San Francisco (PSCSF)

El "Barrenador el fruto" (*N. elegantalis*) presentó la incidencia más alta, llegando a un 36.95 % de frutos dañados. Cabe recalcar que en esta zona de estudio, se observó su valor más alto; por tanto, este insecto fue un grave problema en el área.

La presencia del "Perforador de las flores" también fue alta alcanzando un 21.79 % de inflorescencias afectadas. Es de importancia mencionar la presencia del "Barrenador del tallo" que alcanzó un 33.33 % de plantas dañadas, afectando casi a la tercera parte de las plantas. Los "Defoliadores" presentaron una baja incidencia, con un porcentaje de defoliación de 1 a 5 %, que es un valor bajo y no transcendental en el cultivo. Mientras que el "Barrenador de las ramas" y los "Áfidos "no se presentaron en esta zona.

Análisis general

El "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*) fue el insecto plaga más importante en el cultivo de naranjilla, ya que se presentó en casi todas las localidades muestreadas, alcanzando su valor más alto en la localidad San

Francisco 2, Pichincha. Cabe mencionar que los datos se registraron en fincas donde se aplica control para esta plaga.

El “Barrenador del tallo”, “Barrenador de las ramas” y “Perforador de las flores”, se presentaron con menor incidencia, sin embargo en ciertos lugares su presencia fue importante. El “Barrenador del tallo” alcanzó un 33.33 % de plantas dañadas en la localidad San Francisco 2, Pastaza; el “Barrenador de las ramas” logró un 25 % de plantas dañadas en la localidad Río Negro, Tungurahua.

El “Perforador de las flores alcanzó un 33.22% de ramas dañadas en la localidad El Esfuerzo 1, Pastaza.

Los “Áfidos” y “Defoliadores” no constituyeron problemas como insectos plaga para el cultivo de naranjilla en las localidades muestreadas; ya que los “Áfidos” alcanzaron como valor más alto de presencia un 3.27 % de brotes dañados; mientras que los “Defoliadores” en todas las localidades muestreadas presentaron un porcentaje de área defoliada de 1 a 5 % que no es significativo.

2.2.10.5. Conclusiones

PRIMER ESTUDIO

Se identificaron enemigos naturales en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Pastaza y Napo atacando a larvas del “Barrenador del fruto” (*Neoleucinodes elegantalis*). Entre ellos constan los hongos *Beauveria* sp*. Aspergillus* sp. y *Verticillium* sp, las bacterias *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa*, dos virus de ADN de simple cadena circular y el parasitoide *Copidosoma* sp. (Encyrtidae).

En el estado de pupa emergieron como enemigos naturales sólo parasitoides, todos estos se ubicaron únicamente en la localidad de San Francisco 1, Pichincha. Los parasitoides fueron: *Meteorus* sp. (Braconidae, Meteorinae), *Lymeon* sp., (Ichneumoniae, Cryptinae) y un Ichneumónido (sin identificar).

Los hongos *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp. y *Verticillium* sp. mostraron un porcentaje de infección natural al estado larval de 0.68 %; siendo *Beauveria* sp. al que se lo podría considerar promisorio por sus características para usarlo como biocontrolador. Todos estos hongos fueron hallados en la localidad San Antonio, Pichincha.

Las bacterias *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa* presentaron un porcentaje de infección al estado larval de 0.79 %, siendo *B. cereus* la más común y la que mostró características alentadoras para su posible uso como organismo de control biológico. Todas estas bacterias fueron encontradas en la localidad San Antonio, Pichincha.

Los enemigos naturales que exhibieron el valor más alto de ataque a larvas del “Barrenador del fruto” (*Neoleucinodes elegantalis*) fueron los virus, con un 7.47 %

de infección natural. Se presentaron en las localidades San Antonio, Pichincha; Marinitas, Pichincha; San Francisco 1, Pichincha; Río Negro, Tungurahua; Pindo Mirador, Pastaza; San Juan de Piatúa, Pastaza; San Francisco 2, Pastaza y Mondayacu, Napo.

Los parasitoides constituyen la única medida de control biológico que se pudiese aplicar para el control de pupas de *N. elegantalis*, teniendo en cuenta que su presencia está muy relacionada con el tipo de manejo del cultivo.

El parasitoide ovo – larval *Copidosoma* sp. mostró un porcentaje de ataque de 1.36 %; se presentó en las localidades Río Negro, Tungurahua y Pindo Mirador, Pastaza, podría ser un enemigo natural con amplias posibilidades de control de *N. elegantalis.*

SEGUNDO ESTUDIO

El "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*) fue el insecto plaga que mostró los mayores valores de incidencia en las principales zonas productoras del país, su presencia típica en el cultivo de naranjilla.

La localidad San Antonio, Pichincha fue el área donde se presentaron los valores más altos de incidencia de los diferentes insectos plaga evaluados en comparación con las demás zonas productoras de naranjilla.

Existen áreas como la localidad Saloya, Pichincha en donde la presencia de insectos plaga fue casi nula, por el manejo del cultivo basado en altas aplicaciones de agroquímicos.

La presencia de "Barrenadores del tallo y ramas", "Perforador de las flores", fue importante en las localidades San Francisco 2, Pastaza; Río Negro, Tungurahua; El Esfuerzo 1, Pastaza respectivamente; sin embargo su presencia fue relativamente baja en general en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Pastaza y Napo.

La presencia de áfidos y defoliadores no fue significativa en el cultivo de naranjilla en las localidades muestreadas en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Pastaza y Napo.

2.2.10.6. Recomendaciones

PRIMER ESTUDIO

Realizar pruebas de patogenicidad y/o parasitismo en laboratorio y campo de los diferentes enemigos naturales encontrados, para determinar su importancia y eficiencia en el control del "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*).

Probar la efectividad en el control de larvas de primer instar del “Barrenador del fruto” (*Neoleucinodes elegantalis*), en condiciones de laboratorio y campo, con estudios de agresividad y virulencia usando los hongos y bacterias halladas.

Desarrollar un programa de control biológico mediante el incremento de inóculo de los dos virus encontrados NeelV1 y NeelV2 usando especímenes larvales de (*Neoleucinodes elegantalis*) o en caso de no ser posible su cría, probarlo en larvas de *Galleria mellonella*.

Realizar estudios para la potencialización del parasitoide *Copidosoma* sp.en campo, ya que presenta una alta capacidad de reproducción debido a su característica de generar huevos poliembriónicos.

SEGUNDO ESTUDIO

Determinar estrategias de control del “Barrenador del fruto” (*Neoleucinodes elegantalis*) en las diferentes localidades estudiadas, tomando en cuenta el grado de incidencia que presenta.

Realizar un estudio del daño y la correlación con el rendimiento de la naranjilla, de los insectos plaga encontrados en la localidad San Antonio, Pichincha; por ser la localidad con la más alta presencia de estos insectos.

2.2.10.7. Bibliografía

ANGULO, R. 2006. Lulo: El cultivo. Bogotá, CO. Colciencias. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, CIAT p 3 – 40.

ARAUJO DA SILVA, K. 2003. Application of a novel *Paenibacillus*specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus spp*. in the maize rhizospher. Río de Janeiro, BR. Journal of Micorbiological methods no (54). Consultado 01 feb 2009 p 213 – 23. Disponible en http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T30.

ASOHOFRUCOL (Asociación hortofrutícola de Colombia); CORPOICA (Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria). 2002. El cultivo de lulo: Manual Técnico. Manizales, CO. FNFH. p 1 – 9; 12; 42 –56.

FIALLOS, J. 2000. Naranjilla INIAP – Palora. Híbrido intraespecífico de alto rendimiento. Palora, EC. INIAP. Boletín divulgativo no (276). p 1-11.

ZEDDAM, J. 2008. An isometric virus of the potato tuber moth *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) has a tri-segmented RNA genome. Quito, EC. Journal of Invertebrate Pathology xxx. Consultado 1 feb 2009. Disponible en www.elsevier.com/ locate/yj ipa.

2.2.11. Especies del nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne* sp.) asociadas a la naranjilla (*Solanum quitoense* lam) en ecuador[28].

Objetivo del Proyecto (3): "*Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes".*

2.2.11.1. Objetivos

Objetivo General

Conocer la variabilidad de *Meloidogyne* spp., a nivel de especies para orientar un programa de mejoramiento de variedades de naranjilla resistentes y de identificación de porta injertos resistentes en solanáceas relacionadas.

Objetivo Específico

Verificar la variabilidad de *Meloidogyne* a nivel de especies en las principales zonas naranjilleras de la región amazónica.

2.2.11.2. Marco Referencial

REVELO, J. 2010. Especies del nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne* sp.) asociadas a la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) en Ecuador.

En Ecuador la naranjilla constituye un rubro importante por su contribución a la alimentación y como fuente de trabajo e ingresos. Uno de los factores bióticos que limita su cultivo es el nematodo del nudo de la raíz *Meloidogyne* sp.; parasita a las variedades de naranjilla común (agria, Baeza dulce y espinosa) causando de 70 a 100% de pérdidas. Considerando que el uso de variedades resistentes es el método más rentable, de fácil utilización y que no afecta el ambiente, la salud del agricultor y de los consumidores, se desarrolló este trabajo que tuvo como objetivo conocer la o las especies de *Meloidogyne* de mayor distribución en las zonas naranjilleras de la región amazónica de Ecuador, para orientar un programa de desarrollo de variedades resistentes y de identificación de portainjertos resistentes en solanáceas relacionadas.

Para alcanzar el objetivo propuesto, del 24 de septiembre al 19 de noviembre del 2008, se obtuvieron 19 muestras de raíces de naranjilla y de otros cultivos, en campos de las principales provincias naranjileras de Tungurahua (cantón Baños, parroquia Rio Negro) y Pastaza y Napo de la región amazónica. Para determinar la especie de *Meloidogyne* se utilizó la técnica de la configuración de la zona perineal (genitales), para lo cual de las agallas se extrajeron hembras adultas y se les realizó cortes perineales, los cuales se montaron en placas semipermanentes y se observaron con ayuda de un microscopio (100x). La configuración de la zona

[28] Revelo Jorge

perineal de los especímenes, se comparó con la clave pictórica reportada por Eisenback *et al*. (1983) para las especies más importantes del género *Meloidogyne*. Este trabajo se realizó en el laboratorio de Nematología del Departamento de Protección Vegetal de la E. E. Santa Catalina del INIAP.

Las características de los patrones perineales encontradas en hembras adultas de *Meloidogyne* extraídas de agallas de las raíces de las variedades de naranjilla común, Puyo, Palora y espinosa, correspondieron a *Meloidogyne incognita* con una frecuencia de 42 % (8 campos infestados de 19 muestreados). Las especies *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne arenaria* se determinaron en hembras adultas extraídas de agalla de las raíces de tomate de árbol y papa china.

Los resultados obtenidos permiten alcanzar el objetivo planteado y aceptar la hipótesis de que la especie de *Meloidogyne* más prevalente y de mayor distribución en las zonas naranjilleras de las provincias de Tungurahua y Pastaza, es *Meloidogyne incognita*, especie hacia la cual el programa de mejoramiento genético de la naranjilla debe ser orientado, sin olvidar la importancia que tiene también el hongo *Fusarium oxysporum*.

Palabras claves: *Meloidogye*, identificación de especies, naranjilla, *Solanum quitoense* Lam, variedades común, Palora, Puyo y espinosa.

En Ecuador la naranjilla constituye un rubro importante por su contribución a la alimentación y como fuente de trabajo e ingresos. Este frutal, en los últimos años, ha alcanzado una considerable demanda por la industria y el mercado nacional e internacional, por su aroma, sabor y contenido nutritivo (Revelo y Sandoval, 2003; Andrade, 2005; Revelo*, et al.,* 2010).

Uno de los factores bióticos que afecta el rendimiento de este frutal es el daño a la raíz causado por el nematodo *Meloidogyne incognita* Raza 1 (Eguiguren, 1982). A las variedades de naranjilla común (agria, Baeza dulce y espinosa) les causa de 70 a 100% de pérdidas (INIAP, 1995). Según Soria (1989) en los años 70‘s este nematodo fue el causante de la crisis más aguda del cultivo de naranjilla, época en la que casi llega a desaparecer debido al aumento inusitado de su población.

Este parásito, en la parte aérea de las plantas, produce síntomas de reducción de crecimiento y síntomas similares a la falta de nutrientes y agua (clorosis y marchitez), a causa de las agallas que forma en la raíz y que obstaculizan la absorción de agua y de nutrientes (Taylor y Sasser, 1983). Reduce significativamente los rendimientos y la vida útil de la planta al causarle la muerte prematura entre el período de floración y el inicio de la fructificación (Castañeda, 1992).

Los híbridos Puyo e INIAP – Palora presentan tolerancia y resistencia a este nematodo; sin embargo, la primera produce frutos pequeños, problema que los agricultores solucionan aplicando 2,4 D, una hormona (herbicida) que induce el crecimiento de los mismos pero por su residualidad, la calidad de los mismos es afectada; en cambio, la segunda variedad produce frutos grandes sin aplicación de

la hormona, pero de calidad inferior a la naranjilla común (Fiallos, 2000). Es por esto que muchos agricultores prefieren cultivar las variedades tradicionales (agria, Baeza dulce y espinosa) porque obtienen un precio tres veces mayor que los híbridos, aunque para ello talan el bosque primario causando deforestación.

El método más rentable, de fácil utilización y que no afecta al ambiente y la salud del agricultor y de los consumidores, es el uso de variedades resistentes, que, al evitar el uso de nematicidas, reducen los costos de producción y la contaminación del ambiente.

Si bien el empleo de variedades resistentes constituye la base de la estructura de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, en el caso del cultivo de naranjilla, se considera un error depender únicamente de una variedad resistente como el híbrido Palora para estructurar un programa de manejo, porque a corto plazo su resistencia será vencida como sucedió con el híbrido Puyo que actualmente presenta alta susceptibilidad a *Meloidogyne incognita*.

Para orientar un programa de mejoramiento genético para el desarrollo de variedades resistentes o tolerantes a *Meloidogyne* e identificación de porta injertos resistentes en solanáceas relacionadas, es necesario conocer la especie de mayor frecuencia y distribución.

Con este fin se realizó el presente estudio cuyo objetivo fue determinar la especie de *Meloidogyne* de mayor frecuencia, para orientar correctamente el programa de mejoramiento genético de la naranjilla.

HIPÓTESIS: La especie de *Meloidogyne* más prevalente y de mayor distribución en las zonas naranjilleras de la región amazónica, es *Meloidogyne incognita*

2.2.11.3. Metodología

Para alcanzar el objetivo propuesto, del 24 de septiembre al 19 de noviembre del 2008, se obtuvieron 19 muestras de raíces de naranjilla y de otros cultivos, en campos de las principales provincias naranjileras de la región amazónica que se consignan en el Cuadro 1.

Para determinar la especie de *Meloidogyne* se utilizó la técnica de la configuración de la zona perineal (genitales), para lo cual se extrajeron hembras adultas de las agallas de las raíces. A las hembras se les realizó cortes perineales, los cuales se montaron en placas semipermanentes y se observaron con ayuda de un microscopio (100x). La configuración de la zona perineal de los especímenes, se comparó con la clave pictórica reportada por Eisenback *et al*. (1983) para las especies más importantes del género *Meloidogyne* y, por similitud, se estableció la especie. Este trabajo se realizó en el laboratorio de Nematología del Departamento de Protección Vegetal de la E. E. Santa Catalina del INIAP.

2.2.11.4. Resultados y Discusión

Especies de *Meloidogyne*

Las características de los patrones perineales encontradas en las hembras adultas de *Meloidogyne* estudiadas y que fueron comparadas con la clave pictórica de Eisenback *et al*. (1983), permitió definir claramente las siguientes especies: Un grupo numeroso de hembras adultas de *Meloidogyne* sp., mostraron una configuración perineal de arco dorsal alto y cuadrado (Figura 3) que coincide con la configuración perineal de la especie *Meloidogyne incognita* descrita por Eisenback *et al*. (1983) (figura 4). Pocas hembras de *Meloidogyne* presentaron una configuración perineal de arco dorsal bajo a redondeado, con líneas laterales bien visibles que separan las estrías dorsales de las ventrales (Figura 5), patrón que coincide con la configuración perineal de la especie *Meloidogyne galvánica* descrita por Eisenback *et al*. (1983) (figura 6). Pocas hembras presentaron una configuración perineal de arco dorsal con "hombreras", formadas por ondulaciones pronunciadas de las estrías dorsales, cerca de las líneas laterales que son visibles, de donde las estrías se bifurcan (Figura 7). Este patrón coincide con la especie *Meloidogyne arenaria* descrita por Eisenback *et al*. (1983) (figura 8).

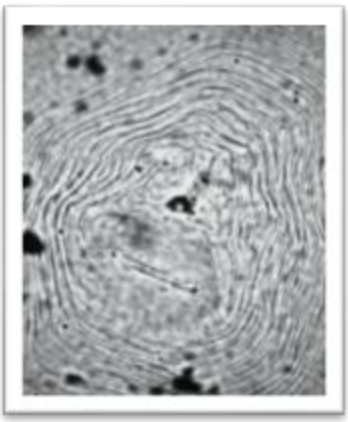
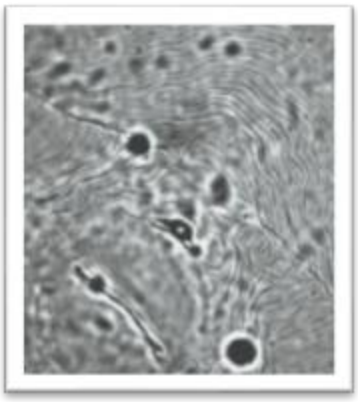


Figura 3. Configuración perineal de *M. incognita* (100 x)

Figura 4. Configuración perineal de *M. incognita* (Eisenback *et al*., 1983)

Figura 5.



Configuración perineal de *M. javanica*

Figura 6. Configuración perineal de *M. javanica* (Eisenback *et al*., 1983)

Figura 7. Configuración perineal de *M. Arenaria*

Figura 8. Configuración perineal de *M. arenaria* (Einsenback*, et al*., 1983)

Incidencia y distribución de las especies de *Meloidogyne*

En plantaciones de naranjilla de la provincia de Tungurahua se determinó la presencia de *M. incognita* en 4 campos (50 %) de 8 muestreados (Cuadro 2). En dos campos ubicados en la parroquia Rio Negro, se determinó también a las especies *M. javanica* y *M. arenaria* en tomate de árbol y papa china, respectivamente; este último campo correspondía a un huerto familiar con varios cultivos. El resto de campos provenían de bosque secundario (realce), potrero de 10 a 20 años y descanso (Cuadro 1).

En cambio en las muestras de 4 plantaciones de naranjilla de la provincia de Napo, no se detectó la presencia de este nematodo, es decir los campos no estaban infestados (Cuadro 2). Este hecho se aduce a que los campos muestreados a lo largo de la vía Hollin Loreto, corresponden a una zona donde el cultivo de naranjilla fue recién introducido con la apertura de la vía, y a que los campos utilizados provienen de bosque secundario de 10 a 20 años (Cuadro 1)
Por su parte, en las muestras tomadas en plantaciones de naranjilla de la provincia de Pastaza, se determinó la presencia de *M. incognita* en 4 campos (42 %) de 7 muestreados (Cuadro 2). Los campos de las plantaciones muestreadas provienen de potrero, descanso 10 años y bosque secundario 10 años (Cuadro 1).

Al analizar en conjunto los resultados de las 19 muestras, *M. incognita* presenta una incidencia de 42 % (8 campos) y una distribución significativa en los campos de las provincias de Tungurahua y Pastaza (Cuadros 1 y 2) consideradas como las más productoras de este frutal. Estos resultados coinciden con los reportados por INIAP (1995, 1982) que indica que la especie *Meloidogyne incognita* es la de mayor distribución en las zonas naranjilleras de la región amazónica.

Además, de acuerdo con los datos consignados en el Cuadro 3, el orden de preferencia de los agricultores por las variedades es: Palora (30 %), común (26 %), Puyo (22 %) y espinosa (22 %), presentando la variedad común la mayor

superficie cultivada por su calidad. De las 4 variedades, Palora es resistente, de ahí su mayor preferencia, sin embargo, todas son parasitadas por *M. incognita*.

En el mismo Cuadro 3, es importante destacar que cualquiera sea la variedad que los agricultores prefieran, éstos utilizan terrenos provenientes de bosque de realce de 10 a 20 años, potreros de 10 a 20 años y terrenos de descanso, para evitar el daño del nematodo, propósito que es alcanzado por el 58 % de agricultores al considerar que *Meloidogyne incognita* está presente en el 42 % de los campos muestreados (Cuadros 1).

Los resultados obtenidos permiten alcanzar el objetivo planteado y aceptar la hipótesis de que la especie de *Meloidogyne* más prevalente y de mayor distribución en las zonas naranjilleras de la región amazónica, es *Meloidogyne incognita*, especie hacia la cual el programa de mejoramiento genético de la naranjilla debe ser orientado, sin olvidar la importancia que tiene también el hongo *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 1. Incidencia de especies de *Meloidogyne* en las zonas del cultivo de naranjilla de la región amazónica. 2009.

Provincias		***Meloidogyne incognita***	***Meloidogyne javanica***	***Meloidogyne arenaria***
Tungurahua (8 muestras)	Campos infestados	4	1	1
	Campos libres	4	4	4
	Incidencia (%)	50		
Napo (4 muestras)	Campos infestados	0	0	0
	Campos libres	4	4	4
	Incidencia (%)	0		
Pastaza (7 muestras)	Campos infestados	4	0	0
	Campos libres	3	3	3
	Incidencia (%)	57		
Tungurahua Napo Pastaza (19 muestras)	Campos infestados	8	1	1
	Campos libres	11		
	Incidencia (%)	42		

Cuadro 2. Frecuencia de cultivo de las variedades de naranjilla, superficie sembrada, tipo de terreno utilizado y especies de *Meloidogyne* identificadas. 2009.

Variedades	Frecuencia (%)	Área sembrada (ha)	Tipo de terreno utilizado	Especies de *Meloidogyne* (%)		
				M. incognita	*M. javánica*	*M. arenaria*
Común	26	5,4	Bosque realce 20 años Potreo 10 años	86	7	7
Palora	30	4,7	Bosque realce 10 años Potrero 20 años	100	0	0
Puyo	22	4,1	Bosque realce 10 a 20 años	100	0	0

			Descanso			
Espinosa	22	4,7	Bosque realce 10 a 20 años Descanso 10 años Potrero 10 a 20 años	100	0	0

2.2.11.5. Bibliografía

ANDRADE, R. 2005. Caracterización de las condiciones agro-socioeconómicas de las familias productoras de naranjilla (*Solanum quitoense*) en la región amazónica del Ecuador. Tesis de Economista. Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Economía. Quito. 155 p.

EGUIGUREN, R. 1982 Prospección, búsqueda de resistencia a nematodos asociados con el cultivo de naranjilla. En Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla. INIAP. Quito. pp. 103-108.

EISENBACK, J.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.; TRIANTAPHYLLOU, A. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne* especies), con una clave pictórica. Traducida del Ingles por Carlos Sosa-Moss. INTERNATIONAL MELOIDOGYNE PROYECT. Raleigh, North Carolina, USA. 48 p.

REVELO, J.; VITERI, P.; VÁSQUEZ, W.; VALVERDE, F.; LEÓN, J.; GALLEGOS, P. 2010. Manual del Cultivo Ecológico de la Naranjilla. Manual Técnico No. 77. INIAP y SENACYT. Quito, Ecuador. 126 p.

TAYLOR, J; SASSER, J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos del nudo de raíz (especies de *Meloidogyne*). Trad. del inglés por el Centro Internacional de la Papa. Universidad Carolina del Norte. Raling. 111p.

2.2.12. Determinación de las características fisicoquímicas y estudio de los índices de calidad en el comportamiento postcosecha de los materiales seleccionados en clones élite provenientes de cruzamientos de naranjilla[29]

Objetivo Del Proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

2.2.12.1. Objetivos

Objetivo General

Determinar los índices de calidad en el comportamiento postcosecha de clones élite de naranjilla.

[29] Priscila López, Beatriz Brito y Wilson Vásquez

Objetivos Específicos

- Realizar el análisis físico-químico y sensorial de trece clones élite de naranjilla, provenientes del Programa de Fruticultura del INIAP, y seleccionar los materiales que reúnan las mejores características de calidad.
- Determinar el estado óptimo de cosecha para mantener la calidad de los clones élite seleccionados, con base al comportamiento durante el almacenamiento al ambiente y en frigo-conservación.
- Caracterizar química y nutricionalmente los mejores materiales y establecer una tabla de color descriptiva para cada clon seleccionado.

2.2.12.2. Marco Referencial

La presente investigación es el complemento a una serie de estudios agronómicos realizados por el Programa de Fruticultura encaminados al mejoramiento de la productividad y calidad de la fruta en función de la demanda. Resultado de estas investigaciones se seleccionó trece materiales promisorios. El estudio permitió evaluar las características de los trece clones seleccionados en campo y del testigo, con el fin de incorporar estas variables en el proceso de selección de nuevos clones, considerando a todos los eslabones de la cadena productiva.

Dada la alta perecibilidad de la naranjilla, se estableció el punto óptimo de corte debido a que el estado de madurez a la cosecha es uno de los principales factores que determinan la calidad de la fruta y su valor nutritivo. El estado de madurez también incide en la deshidratación, las pudriciones, transporte y almacenamiento; afectando la vida del producto y con ello los ingresos de los productores. Se utilizó la fruta cosechada de los lotes de investigación que mantiene el Programa de Fruticultura en la provincia de Pichincha y Pastaza, se seleccionaron los clones de naranjilla, que presentaron las mejores características físicas, químicas y sensoriales, en los cuales se realizó el estudio de la conservación, estableciéndose el momento adecuado de la cosecha y el tiempo de vida útil, teniendo como testigo a la variedad de jugo INIAP Quitoense 2009.

2.2.12.3. Metodología

Materia prima

Frutos de 13 clones élite de naranjilla y el testigo, los que fueron cosechados en tres estados de madurez: 100 %, 75 % y 50 % de viraje de color de cubrimiento de verde a amarillo-naranjado. Las frutas se obtuvieron de las huertas que mantiene el Programa de Fruticultura del INIAP en el Triunfo, provincia de Pastaza.

Equipos y accesorios

Se utilizaron los siguiente equipos y accesorios: balanza semi analítica, cuarto de congelación y conservación, calibrador digital, penetrómetro manual de 0–14 kgf, refractómetro manual de 0 a 32° Brix, pH metro, licuadora, higrotermógrafo digital,

liofilizador, medidor de color, reflectómetro, material de vidrio, soporte universal, gavetas, tinas, mesa de corte de acero inoxidable, materiales de limpieza y aseo.

Factores de estudio fase I y fase II

En la Fase I, corresponden los trece clones de naranjilla y el testigo**,** que se consideran los tratamientos, presentados en el cuadro 1. En la Fase II, los tratamientos resultan de la combinación de los factores descritos con sus respectivos niveles, los cuales se detallan en los cuadros 2, 3 y 4, tanto para el almacenamiento al ambiente natural, como el ambiente controlado.

Cuadro 1. Tratamientos en estudio. Fase I

Código	CRUZAMIENTOS DE NARANJILLA
T1	*Solanum quitoense x Solanum vestissimum.*
T2	*Solanum quitoense x Solanum vestissimum* (semilla).
T3	*Solanum quitoense* variedad dulce *x S. vestissimum* (semilla).
T4	*Solanum hyporhodium x Solanum quitoense* variedad dulce.
T5	*Solanum quitoense* variedad dulce *x Solanum hyporhodium*.
T6	*Solanum. quitoense* variedad peluda x (*Solanum quitoense* variedad dulce *x Solanum vestissimum*).
T7	(*Solanum vestissimum* x *Solanum quitoense* F1)x *Solanum quitoense* F1.
T8	*Solanum quitoense* variedad baeza x (*Solanum quitoense* variedad dulce x *Solanum vestissimum*).
T9	(*Solanum vestissimum x Solanum quitoense* variedad dulce F1)x *Solanum quitoense* variedad dulce F1.
T10	(*Solanum quitoense* x *Solanum hyporhodium)* x *Solanum quitoense* variedad dulce.
T11	*Solanum quitoense* variedad baeza.
T12	*Solanum quitoense* variedad peluda.
T13	Híbrido Puyo.
TESTIGO (T)	*Solanum quitoense* Lam. INIAP Quitoense 2009

Cuadro 2. Factor a: niveles para los ecotipos seleccionados. Fase II

ECOTIPOS	CÓDIGO
Solanum quitoense x *Solanum vestissimum.* (semilla)	N2
Solanum quitoense variedad dulce x *Solanum hyporhodium*	N5
Solanum quitoense variedad Baeza x (*Solanum quitoense* variedad Dulce x *Solanum vestissimum*)	N8
Testigo: *Solanum quitoense Lam*	N

Cuadro 3. Factor b: períodos de almacenamiento. Fase II

AMBIENTE NATURAL		AMBIENTE CONTROLADO	
PERIODOS (días)	CODIGO	PERIODOS (días)	CODIGO
0	A1	0	F1
5	A2	10	F2
10	A3	20	F3
15	A4	30	F4
20	A5	35	F5
25	A6	40	F6
30	A7	45	F7

Cuadro 4. Factor c: estados de madurez de la fruta. Fase II

ESTADOS DE MADUREZ	CÓDIGO
≈ 50 % viraje de color: verde a amarillo - anaranjado	E1
≈ 75 % viraje de color: verde a amarillo - anaranjado	E2

Diseño experimental

Para la Fase I, se aplicó el Diseño Completamente al Azar (DCA) en los catorce tratamientos, que corresponden al total, en los cuales se analizó las propiedades físicas en 20 repeticiones y propiedades físicas y químicas en tres repeticiones.

Para la Fase II, en los dos tipos de almacenamientos se empleó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA) con arreglo factorial A x B x C. El factor A, son los ecotipos, con 4 niveles. El factor B, con 7 niveles son los períodos de almacenamiento. El factor C, son los estados de madurez con 2 niveles. Resultando 56 tratamientos, con tres repeticiones, para cada tipo de almacenamiento.

Análisis estadístico

El esquema de análisis de varianza utilizado en la fase I, y II para los dos tipos de almacenamiento, se presentan en el Cuadro 5 y 6.

Cuadro 5. Esquema del análisis de varianza fase I

FUENTES DE VARIACIÓN	P. FÍSICAS	P. FISICO QUÍMICAS
	G. L.	G. L.
TOTAL	279	41
Tratamientos	13	13
Error Experimental	266	28

Tanto para la Fase I y II, se calculó el coeficiente de variación CV (%) y se realizó pruebas de significación de Tukey al 5 %, para tratamientos. Además en la fase I, se evaluó las características organolépticas mediante un diseño de bloques completamente al azar BCA y la prueba de Tukey al 5 %. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus, versión 4.0.

Cuadro 6. Esquema del análisis de varianza fase II

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	
TOTAL	(N x A x E x r) -1	167
Tratamientos	t-1	55
Repeticiones	r-1	2
Ecotipos (T)	n-1	3
Períodos de Almacenamiento (A)	A-1	6
Estados de madurez (E)	E-1	1
Interacciones		
N x A	(N -1) (A -1)	18
NxE	(N-1)(E-1)	3
A x E	(A -1) (E -1)	6
N x A x E	(N -1) (A -1) (E -1)	18
Error Experimental	Diferencia	110

Manejo específico del experimento

Los clones seleccionados y el testigo se cosecharon en la localidad del Puyo, se transportó a la Unidad de Procesamiento de Frutas del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, en donde se realizó las operaciones adecuadas de postcosecha como son: selección, limpieza, desinfección, secado y clasificación, Para la fase I, se cosechó fruta en su madurez comestible (100% maduro), mientras que para la fase II, se cosechó en los estados de madurez correspondientes al grado 3 y 4, es decir 50 % y 75 % de viraje de verde a amarillo-naranja, respectivamente. Se cortaron los frutos sanos, con 2 cm de pedúnculo y sin quitar el cáliz, para luego ser transportadas al laboratorio.

Procedimiento

En la fase I, para realizar la selección de los materiales con mejores características de calidad, se realizó la caracterización física en la fruta entera que comprende las determinaciones de peso, relación de longitud y diámetro, firmeza de la pulpa, y rendimientos. Las determinaciones físico-químicas realizadas en la pulpa de la fruta fueron sólidos solubles, pH, acidez titulable, consistencia, color, pardeamiento de la pulpa y vitamina C. En el análisis sensorial se evaluó los atributos de color, sabor, aroma y dulzor, mediante una prueba del nivel de aceptabilidad de las pulpas de naranjilla, comparándolo con el testigo de la variedad de jugo INIAP Quitoense 2009. El panel de catación estuvo conformado por 25 panelistas no entrenados de ambos sexos.

Para determinar la madurez óptima y la calidad de la fruta, al finalizar el tiempo de cada período de almacenamiento, tanto al ambiente como en condiciones controladas, se realizó evaluaciones físicas las cuales fueron pérdida de peso, descripción visual de la fruta y firmeza de la pulpa. Las evaluaciones físico-químicas con la pulpa de la fruta consistieron en sólidos solubles, pH, acidez titulable, color, pardeamiento de la pulpa, vitamina C y relación de madurez. El almacenamiento al ambiente natural se realizó a temperatura y humedad relativa promedio de 17º C y 59 % de humedad relativa, el almacenamiento al ambiente controlado, se realizó en un cuarto frío, con las condiciones de temperatura de 8° C $\pm$ 2 y humedad relativa del 80 %.

Análisis químico y nutricional y tabla de color descriptiva de los clones seleccionados

Se realizó la caracterización química y nutricional de los clones élite, seleccionados para la conservación, se utilizó la fruta fresca recién cosechada en su estado de madurez organoléptico, en las que se realizó análisis de pH, acidez titulable, sólidos solubles, humedad, cenizas, fibra, extracto etéreo, proteína, carbohidratos totales, macro y micro elementos minerales, vitamina A, vitamina C, azúcares totales, azúcares reductores, polifenoles totales y carotenoides totales. Además se estableció una tabla de color descriptiva en los diferentes estados de

madurez de la fruta, que incluye fotografías en los estados de madurez de 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de viraje de color verde a amarillo – anaranjado, en donde se señala algunos parámetros de calidad.

2.2.12.4. Resultados y discusión

Selección por calidad de los mejores clones élite de naranjilla. fase I

La selección de los clones élite de naranjilla se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización física, química y sensorial. Según MAG –IICA, en el 2001, señala que entre las principales características y las condiciones de calidad, para la exportación de la naranjilla, son que la fruta debe tener una apariencia sana, fresca, consistencia firme y color intenso, cumplir con las medidas entre 5 y 6 cm de diámetro, pesos entre 90 y 140 g.

En la caracterización física de los tratamientos, los clones 2, 5 y 8, reunieron los requisitos de calidad que se mencionan para la exportación, además de mostrar características parecidas al testigo que corresponde a la variedad mejorada de jugo INIAP Quitoense 2009. Estos clones presentaron valores altos de peso, largo, diámetro, relación L/D apropiada, rendimiento en pulpa, por lo que se ubicaron en los primeros grupos estadísticos en la prueba de Tukey al 5 %. Con relación a la firmeza y la consistencia de la pulpa, los resultados señalan que tienen valores bajos de firmeza y altos de consistencia (más líquida) en comparación con el testigo.

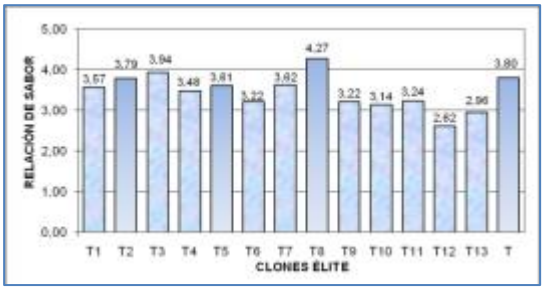
Al analizar el color, los tres clones demuestran una luminosidad intermedia, espacio de color (° Hue) entre amarillo y rojo, cromaticidad o intensidad del color cercanas a las del testigo, el índice de oscurecimiento para el clon 8, se situó en los primeros rangos estadísticos, tanto a los 0 como a los 60 minutos, los clones 2 y el clon 5, se comportaron de la misma manera pero al cabo de una hora de evaluación. Los clones 2, 5 y 8 presentaron un bajo incremento en el índice de oscurecimiento, de la misma manera que el testigo y frente a los demás clones en estudio.

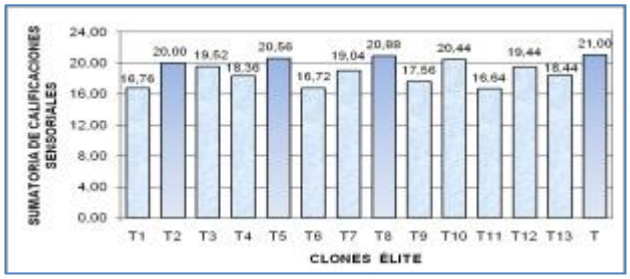
Los resultados de la caracterización química expresada mediante el contenido de sólidos solubles y pH, indican que los clones 2, 5 y 8 presentan valores óptimos, incluso superiores a los del testigo, mientras que para la acidez tiene valores bajos, similares a los del testigo, comprobándose mediante la prueba de Tukey al 5 % al conformar los primeros rangos estadísticos. Así mismo, estos clones reflejan resultados adecuados en la relación de sabor, obtenida de la división entre los sólidos solubles y la acidez de la fruta, resultados que se presentan en el gráfico 1.

Respecto al análisis sensorial los clones seleccionados, coinciden con la selección realizada en la caracterización física y química. Con el fin de distinguir los clones que tuvieron mayor aceptabilidad, se efectuó una sumatoria de las calificaciones de los degustadores para los cuatro atributos, los clones 2, 5 y 8 que fueron

seleccionados, además del testigo, que tienen las más altas puntuaciones, como se observa en el gráfico 1.

Gráfico 1. Relación de sabor y aceptabilidad referente a la calificación total obtenida en el análisis sensorial para los clones élite y el testigo





Conservación en ambiente natural. Fase II

El análisis de varianza detectó que existen diferencias altamente significativas para tratamientos, repeticiones, factor N (clones), factor A (períodos de almacenamiento) y factor E (estados de madurez), con excepción de los sólidos solubles y pH, que para el factor E resultaron ser no significativas. Las interacciones, clones por períodos de almacenamiento, y clones por estados de madurez, presentaron diferencias altamente significativas en todas las variables. La interacción períodos de almacenamientos por estados de madurez, señala alta significación estadística para las variables pérdida de peso, firmeza, sólidos solubles, pH y acidez; mientras que para la relación de sabor y vitamina C, no existe significación.

La interacción clones por períodos de almacenamiento por estados de madurez, demostró diferencias altamente significativas en todas la variables, por lo que se realizó la prueba de Tukey al 5% únicamente para esta interacción, debido a que a conjuga los tres factores en estudio, siendo de mayor importancia para esta investigación. Los coeficientes de variación se encuentran en el rango normal definido para el análisis de laboratorio que es hasta el 12%, habiéndose reportado el más alto de 9,06 para la firmeza, debido a que durante el almacenamiento se produce un ablandamiento de los tejidos no uniforme en la fruta, parte de la superficie se encuentra en contacto con otros frutos, existiendo presión y por ende la tendencia a suavizarse, mientras que la parte sin contacto no se ve afectada.

Cuadro 7. Análisis de varianza de los índices de madurez evaluados en el almacenamiento al ambiente natural

F de V	GL	ft			Pérdida Peso	Firmeza	Sólidos Solubles	pH	Acidez titulable	Relación sabor	Vitamina C
Total	167	0.05	0.01	SC	16878,22	749,81	416,26	5,75	29,62	413,25	2051,36
Tratamientos	55	1,46	1,69	SC	16841,71	743,44	406,89	4,97	28,57	405,04	2028,16
				CM	306,21	13,52	7,40	0,09	0,52	7,36	36,88
				fc	927,92**	225,28**	92,48**	9,04**	51,95**	105,21**	175,60**
Repeticiones	2	3,08	4,8	SC	0,42	0,01	0,24	0,05	0,03	0,27	0,40

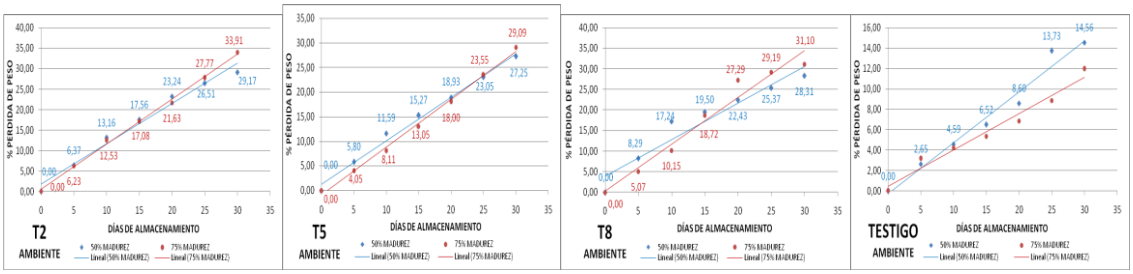
				CM	0,21	0,01	0,12	0,02	0,01	0,13	0,20
				fc	0,64^{ns}	0,13^{ns}	1,42^{ns}	3,44^{ns}	1,61^{ns}	1,84^{ns}	0,96^{ns}
N: Clones	3	2,69	3,96	SC	3135,09	36,86	305,44	1,87	14,53	210,66	829,09
				CM	1045,03	12,29	101,81	0,62	4,84	70,22	276,36
				fc	3184,42**	212,69**	1225,55**	94,48**	522,13**	971,87**	1332,78**
A: Períodos de Almacen.	6	2,18	2,97	SC	12252,21	633,29	6,74	0,15	1,68	15,34	39,16
				CM	2042,03	105,55	1,12	0,03	0,28	2,56	6,53
				fc	6222,5**	1827,23**	13,52**	3,9**	30,11**	35,39**	31,47**
E: Estados de Madurez	1	3,93	6,88	SC	8,60	11,50	0,01	0,00	1,65	10,04	244,49
				CM	8,60	11,50	0,01	0,00	1,65	10,04	244,49
				fc	26,21**	199,14**	0,18^{ns}	0,09^{ns}	177,65**	138,96**	1179,09**
NA: Clones x P. de Almacen.	18	1,71	2,11	SC	1163,00	34,18	44,79	2,31	8,30	154,22	340,34
				CM	64,61	1,90	2,49	0,13	0,46	8,57	18,91
				fc	196,88**	32,88**	29,95**	19,52**	49,71**	118,58**	91,18**
NE: Clones x E. de Madurez	3	2,69	3,96	SC	23,34	6,83	2,75	0,32	0,49	5,46	307,41
				CM	7,78	2,28	0,92	0,11	0,16	1,82	102,47
				fc	23,71**	39,42**	11,04**	16,3**	17,5**	25,19**	494,17**
AE: P. de Almacen. x E. de Madurez	6	2,18	2,97	SC	74,57	7,19	11,53	0,07	0,37	0,93	97,63
				CM	12,43	1,20	1,92	0,01	0,06	0,15	16,27
				fc	37,87**	20,74**	23,14**	1,85**	6,61**	2,13^{ns}	78,47^{ns}
NAE: Clones x P. de Almacen x E. deMadurez	18	1,71	2,11	SC	184,90	13,59	35,63	0,25	1,55	8,39	170,04
				CM	10,27	0,75	1,98	0,01	0,09	0,47	9,45
				fc	31,3**	13,07**	23,83**	2,13**	9,29**	6,45**	45,56**
Error Experimental	110	-	-	SC	36,10	6,35	9,14	0,72	1,02	7,95	22,81
				CM	0,33	0,06	0,08	0,01	0,01	0,07	0,21
Coeficiente de variación (%)					4,18	9,06	2,36	2,46	4,09	4,98	3,49

**: Altamente significativo *: Significativo NS: No significativo

Pérdida de peso y firmeza de la pulpa

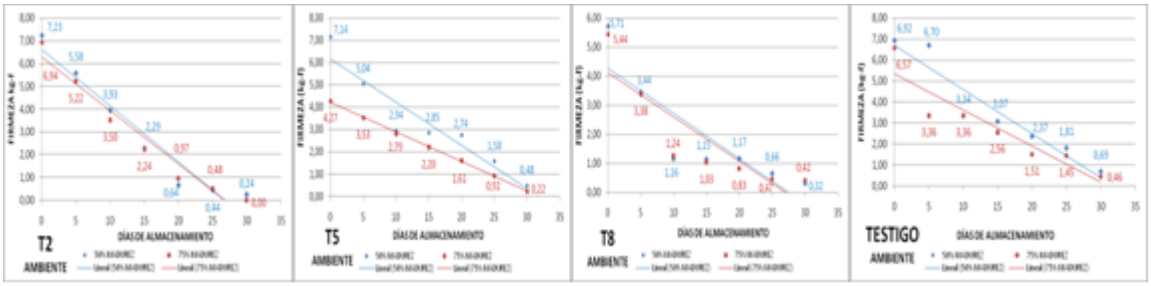
La temperatura y la humedad relativa, influyeron en la deshidratación de la fruta, además de que la fruta cumple con su función fisiológica de la transpiración, causas que constituyen la pérdida de peso, esta observación se detectó en todos los clones seleccionados, presentándose tendencia lineal, lo que permitió establecer ecuaciones en los dos estados de madurez, siendo importante para predecir las pérdidas de peso al cabo de cualquier tiempo con el fin de ayudar a programar el almacenamiento y actividades tanto de postcosecha como de industrialización. Los comportamientos de los clones élite seleccionados, se pueden apreciar en el gráfico 2.

Gráfico 2. Pérdida de peso de los clones élite seleccionados y el testigo durante la conservación al ambiente natural



Respecto a la firmeza de la fruta, durante el almacenamiento se presentaron cambios estructurales, los cuales provocan el ablandamiento de los tejidos, este proceso forma parte del envejecimiento, que en determinado tiempo colapsan y mueren finalmente con la senescencia del fruto. Este comportamiento se observa en el gráfico 3, en donde la firmeza de todos los clones élite seleccionados y el testigo, para los dos estados de madurez, disminuyen con el tiempo de conservación. La tendencia lineal, permitió describir su comportamiento a través de ecuaciones, las cuales sirven para predecir el comportamiento de la fruta en distintos períodos de conservación.

Gráfico 3. Variación de la firmeza de los clones élite seleccionados y el testigo, durante la conservación al ambiente natural



Daños visuales

Este índice de madurez es subjetivo, debido a que utiliza los órganos de los sentidos, en este caso la vista, por lo tanto sus resultados son propensos a variar considerando el criterio del analista, sin embargo los tres tipos de daños encontrados se relacionan con el manejo agronómico del cultivo que incide en la calidad poscosecha de la fruta.

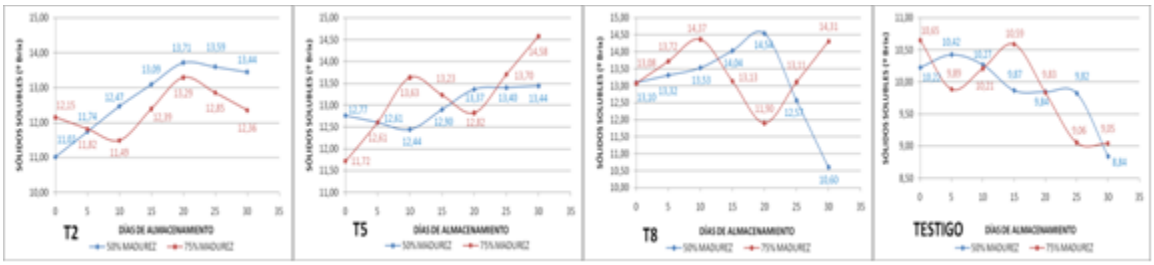
El daño poscosecha identificado con mayor intensidad durante este almacenamiento fue la deshidratación de la naranjilla, aunque a medida que pasó el tiempo de almacenamiento también se hicieron presentes otros tipos de daños que desencadenaron en la pudrición de la fruta. Los resultados señalan que con el pasar del tiempo de almacenamiento los daños aumentan dentro de la escala de intensidad sugerida, así como el porcentaje de daños se incrementa con el grado de madurez, siendo mayor para la fruta con el viraje de color de 75%.

Sólidos solubles, pH y acidez

Con respecto al pH, al analizar el comportamiento de los clones élite en cada estado de madurez, se observa que en existe un leve incremento y una tendencia a permanecer constante esto demuestra que durante el almacenamiento la influencia de la temperatura y la humedad relativa del ambiente sobre el pH es mínima.

Los sólidos solubles como se muestra en el gráfico 4, se observa que su contenido aumenta durante el almacenamiento, los máximos valores durante los períodos de almacenamiento, coinciden con los días los cuales las naranjillas presentan su mayor tiempo de vida útil y por ende su mayor desarrollo de madurez, luego de este período se registra una leve declinación, hasta el final del almacenamiento, sin embargo en el caso en el que el que se sigue apreciando un aumento, se debe no solo al aumento de los azúcares de la fruta, sino también a los pigmentos propios de la fruta, los cuales de la misma manera se acrecientan con la deshidratación de la fruta.

Gráfico 4. Contenido de sólidos solubles de los clones élite y el testigo durante la conservación al ambiente natural



En forma general, la acidez disminuye o tiende a mantenerse, para la mayoría de los clones élite en estudio, a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, resultado que concuerda con el contenido de sólidos solubles, al presentar un aumento, sin embargo en el clon elite 8, se aprecia que existe un incremento de la acidez en los primeros períodos de almacenamiento, esto se debe a que este clon siga desarrollando su sabor característico, observación importante que establece la aceptación o rechazo de la fruta por parte del consumidor. El ascenso de la acidez en los últimos períodos de almacenamiento es consecuencia de las fermentaciones, procesos que se presentan cuando la fruta ha llegado a la senescencia. Es necesario recalcar que los resultados de las variaciones de la acidez se relacionan con la vida útil de cada clon élite en estudio.

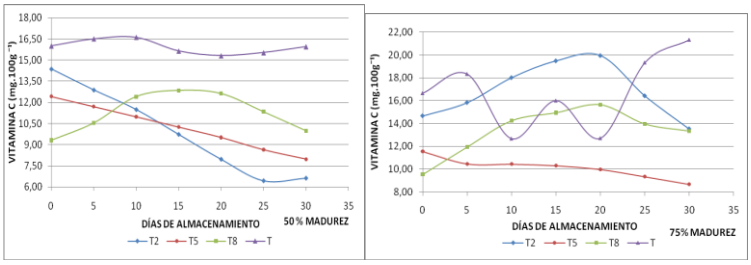
Relación de sabor y vitamina C

En general los frutos con 50% de madurez, presentan tendencia a aumentar o a conservar la relación de sabor, con el pasar el tiempo de almacenamiento, esta tendencia se observó para todos los clones a excepción del clon élite 8, el cual presenta descenso hasta los 10 días de almacenamiento, luego del cual aumenta

ligeramente hasta mostrarse casi constante. Las naranjillas con 75% de madurez, mostraron de igual manera un comportamiento similar a las de 50%, pero cabe señalar que los valores de la relación de sabor fueron mayores respecto del otro estado de madurez, se observa una diferencia acentuada para el clon élite 8 ya que la relación de sabor empieza a bajar hasta los 10 días de almacenada la fruta para luego permanecer constante, esta disminución de la relación de sabor puede deberse por efecto mismo de la maduración de la fruta, característica especial de este clon élite.

El comportamiento de los clones élite respecto de la vitamina C, refleja que disminuye o permanece constante con el pasar el tiempo de almacenamiento como se observa en el gráfico 5, sin embargo el clon élite 8 y el testigo, presentaron un ligero aumento en ciertos períodos de almacenamiento, los cuales coinciden con el tiempo de vida útil de la fruta.

Gráfico 5. Vitamina C, de los clones élite en estudio, durante la conservación al ambiente



Color y pardeamiento de la pulpa

Referente a los componentes del color en todos los clones élite, para los dos estados de madurez, sometidos al almacenamiento, se observó que la luminosidad disminuye a medida que transcurren los días de almacenamiento, debido a que las pulpas se vuelven opacas. Para los parámetros a (rojo = a^+, verde = a^-) y b (amarillo = b^+, azul = b^-), se obtuvo una relación inversamente proporcional, es decir, mientras el color verde disminuye, el color amarillo aumenta conforme pasan los períodos de almacenamiento, resultado que coincide con el ángulo Hue, que se aprecia que aumenta, aunque sigue estando en el espacio de color entre verde y amarillo, se aprecia que con el pasar del tiempo de almacenamiento, la tonalidad amarilla aumenta. los valores de cromaticidad, revelan que se sitúan entre, 20 y 30, sin embargo a medida que trascurre el tiempo de almacenamiento esta aumenta, lo que indica que la intensidad del color de la pulpa se acentúa volviéndose cada vez más pura, mientras que el pardeamiento de la pulpa, se registró a medida que avanza el proceso de almacenamiento, siendo en algunos clones mayor el índice de oscurecimiento en los primeros períodos de almacenamiento, debido a que la fruta no ha completado su proceso de maduración.

Conservación al ambiente controlado

A través del almacenamiento de la fruta bajo condiciones de 8º C y ± 2° C y 80 % de humedad relativa, se logró disminuir la intensidad respiratoria, la transpiración de la fruta que consiste en las pérdidas de agua, los procesos de maduración a través de la producción de etileno, así como inhibir el crecimiento de microorganismos. En el cuadro 6, se muestran los resultados de los análisis de varianza obtenidos de las variables evaluadas durante el almacenamiento al ambiente controlado.

El análisis de varianza, en todas las variables detectó diferencias altamente significativas para tratamientos, mientras que para las repeticiones resultó ser no significativo. Referente al factor clones existe diferencias altamente significativas en todas las variables analizadas. Para el factor períodos de almacenamiento se encontró diferencias altamente significativas para todas las variables a excepción de los sólidos solubles que fue no significativa. En el factor estados de madurez se presentó diferencias altamente significativas en casi todas las variables, sin embargo en las evaluaciones de pH y la relación de sabor se aprecia diferencias significativas.

En cuanto a las interacciones de acuerdo al diseño factorial aplicado como son: clones por períodos de almacenamiento, clones por estados de madurez, períodos de almacenamiento por estados de madurez y la interacción clones por períodos de almacenamiento y por estados de madurez, se identificaron que existe diferencias altamente significativas, en todas las evaluaciones realizadas.

Cuadro 8. Análisis de varianza de los índices de madurez evaluados durante el almacenamiento controlado

F de V	Gl	ft			Pérdida Peso	Firmeza	Sólidos Solubles	pH	Acidez Titul.	Relación Sabor	Vitamina C
Total	**167**	**0.05**	**0.01**	**SC**	10049,22	812,05	304,52	11,07	64,29	1343,01	1639,21
Tratamientos	**55**	**1,46**	**1,69**	**SC**	10020,88	800,88	291,11	10,42	63,60	1331,20	1621,21
				CM	182,20	14,56	5,29	0,19	1,16	119,39	29,48
				fc	728,79**	145,61**	44,11**	18,95**	115,64**	1193,9**	184,23**
Repeticiones	**2**	**3,08**	**4,8**	**SC**	0,40	0,45	0,09	0,03	0,03	0,66	0,16
				CM	0,20	0,23	0,05	0,02	0,01	0,33	0,08
				fc	$0,79^{ns}$	$2,33^{ns}$	$0,38^{ns}$	$2,97^{ns}$	$2,13^{ns}$	$3,28^{ns}$	$0,5^{ns}$
N: Ecotipos	**3**	**2,69**	**3,96**	**SC**	1018,72	60,69	190,55	8,23	56,89	1267,19	779,71
				CM	339,57	20,23	63,52	2,74	18,96	422,40	259,90
				fc	1336,47**	207,99**	525,08**	483,5**	3106,01**	4168,92**	1603,4**
A: Períodos de Almacenamiento	**6**	**2,18**	**2,97**	**SC**	8404,61	634,20	0,75	0,42	0,94	4,38	25,98
				CM	1400,77	105,70	0,13	0,07	0,16	0,73	4,33
				fc	5513,07**	1086,68**	1,04ns	12,26**	25,6**	7,2**	26,72**
E: Estados de Madurez	**1**	**3,93**	**6,88**	**SC**	35,55	39,38	3,50	0,04	0,15	0,57	185,83
				CM	35,55	39,38	3,50	0,04	0,15	0,57	185,83
				fc	139,91**	404,88**	28,91**	6,61*	24,18**	5,67*	1146,42**

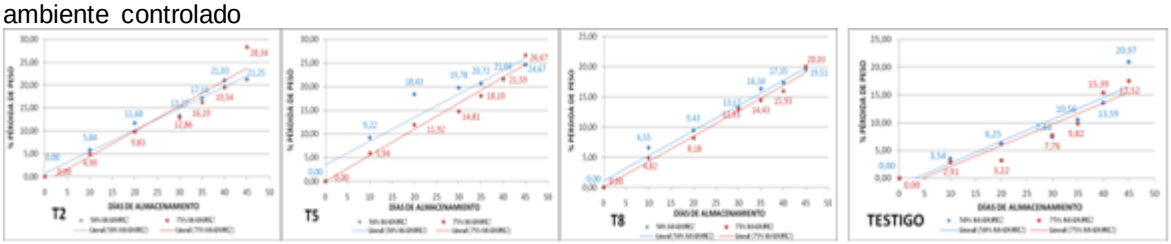
NA: Ecotipos x P. de Almacenamiento	18	1,71	2,11	SC	323,61	20,78	70,25	1,09	3,09	24,25	167,89
				CM	17,98	1,15	3,90	0,06	0,17	1,35	9,33
				fc	70,76**	11,87**	32,26**	10,65**	28,14**	13,3**	57,54**
NE: Ecotipos x E. de Madurez	3	2,69	3,96	SC	30,78	12,53	2,97	0,11	0,28	4,52	120,27
				CM	10,26	4,18	0,99	0,04	0,09	1,51	40,09
				fc	40,38**	42,95**	8,18**	6,37**	15,3**	14,88**	247,32**
AE: Períodos de Almacenamiento x E. de Madurez	6	2,18	2,97	SC	80,58	12,57	1,90	0,08	0,14	1,53	118,04
				CM	13,43	2,09	0,32	0,01	0,02	0,25	19,67
				fc	52,86**	21,53**	2,62*	2,46*	3,77**	2,51*	121,37**
NAE: Ecotipos x P. de Almacenamiento x E. deMadurez	18	1,71	2,11	SC	127,03	20,73	21,19	0,45	2,11	28,76	223,49
				CM	7,06	1,15	1,18	0,03	0,12	1,60	12,42
				fc	27,78**	11,84**	9,73**	4,45**	19,16**	15,77**	76,60**
Error Experimental	110	-	-	SC	27,95	10,70	13,31	0,62	0,67	11,15	17,83
				CM	0,25	0,10	0,12	0,01	0,01	0,10	0,16
Coeficiente de variación (%)					4,19	10,06	2,91	2,19	3,55	5,14	3,24

**: Altamente significativo *: Significativo NS: No significativo

Pérdida de peso y firmeza

Las pérdidas de peso para la conservación al ambiente controlado, resultó ser menor que para el almacenamiento al ambiente natural, en todos los clones élite y el testigo, observándose la acción beneficiosa de la temperatura como de la humedad relativa en la conservación de peso del fruto, no obstante se presentó una tendencia lineal al aumentar en forma gradual las pérdidas durante todo el almacenamiento, lo que permitió establecer ecuaciones que sirven para pronosticar las pérdidas en determinado tiempo, esto se observa visiblemente en el testigo con 75% de madurez, en donde a los 10 días al ambiente natural las pérdidas se registran en 4.27%, mientras que en el ambiente controlado obtuvo pérdidas del 2.91% del peso inicial. En el gráfico 6, se presenta el comportamiento en los dos estados de madurez de los clones élite y el testigo, bajo las condiciones controladas.

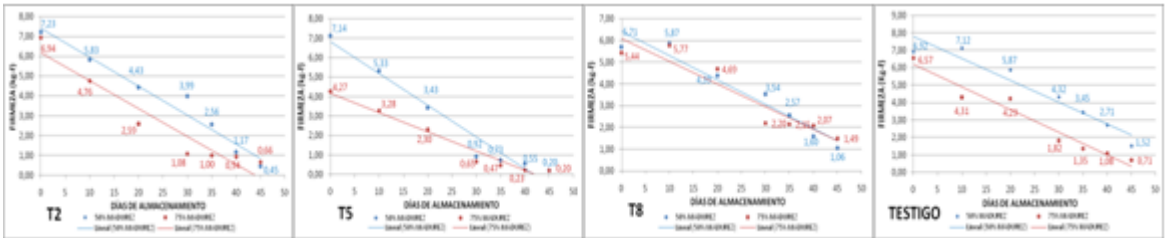
Gráfico 6. Pérdida de peso de los clones élite seleccionados y el testigo durante la conservación en ambiente controlado



La firmeza presenta cambios similares respecto a las pérdidas de peso, así se observa que aunque la firmeza decrece a medida que trascurre el tiempo, la resistencia a la penetración es mayor durante el ambiente controlado que para la conservación al ambiente controlado, ya que existe menor deshidratación en la fruta y consecuentemente los tejidos duran más firmes por más tiempo. Como se

observa en el gráfico 7, gracias a la tendencia lineal se logró establecer las ecuaciones de comportamiento para cada estado de madurez, en los clones sometidos almacenamiento.

Gráfico 7. Variación de la firmeza del clon élite 2, durante la conservación en ambiente controlado



Daños visuales

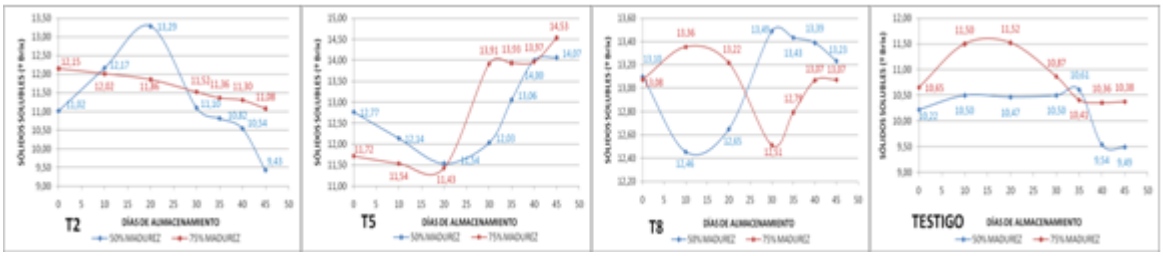
Como en el almacenamiento al ambiente, se observa que en la medida que aumenta el grado de madurez se incrementa el porcentaje de daños, sin embargo se observa que los daños se reducen notablemente en el almacenamiento al ambiente controlado, lo que hace que la fruta dure más tiempo en buenas condiciones, también en este almacenamiento, el tipo de daño con mayor repercusión fue la deshidratación.

Sólidos solubles, pH y acidez

Los sólidos solubles para el caso del almacenamiento al ambiente controlado, se aprecia que existe el mismo comportamiento con respecto al ambiente natural, así los rangos en que se presentan los valores de lo sólidos solubles, son casi similares, en ciertos períodos de almacenamiento, demostrando que las condiciones de temperatura en los dos almacenamientos tienen poca influencia en esta variable. Como se observa en el gráfico 8, los sólidos solubles ascienden y se mantienen casi constantes durante algunos períodos, para luego declinar hasta el final del almacenamiento como en el caso del clon 2 y el testigo.

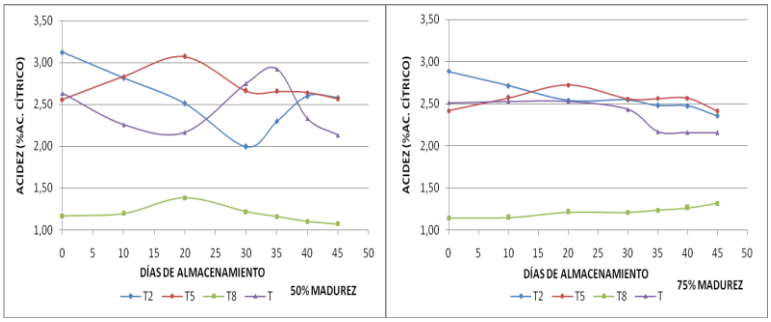
Sin embargo en el clon élite y el testigo, los sólidos siguen aumentando hasta el final del almacenamiento, producto de la degradación de carbohidratos de cadenas largas como substancias pécticas y hemicelulosa, las cuales debilitan las paredes celulares, que se traduce en el deterioro de la fruta. Los valores máximos de sólidos solubles, coinciden con el tiempo máximo que la fruta puede durar tanto para el consumo en fresco como con fines agroindustriales, notándose que los sólidos solubles con madurez de 75% es mayor para la fruta con 50%.

Gráfico 8. Evolución de los sólidos solubles de los clones élite y el testigo durante la conservación en ambiente controlado



La acidez de la fruta en los clones 2 y el testigo disminuyen, y se mantienen constantes en ciertos períodos de almacenamiento para luego incrementar el contenido de ácido cítrico, esto es visible especialmente en la fruta con madurez de 50%. Caso contrario sucede con las frutas del clon 5 y 8, en las cuales tienden a aumentar durante todo el proceso, para desarrollar su sabor ácido, característico de las naranjillas. Estas variaciones se relacionan con el contenido de sólidos solubles en la fruta, al mostrarse inversamente proporcional y con el registro de daños visuales. Los comportamientos de la acidez para los clones almacenados en los dos estados de madurez, en este almacenamiento se señalan en el gráfico 9.

Gráfico 9. Variación de la acidez, de los clones élite y el testigo durante la conservación en ambiente controlado



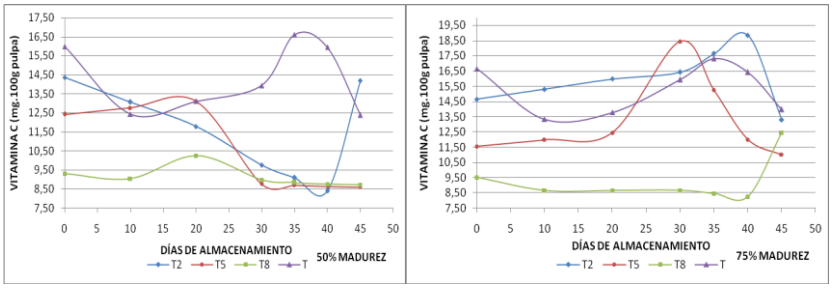
Respecto al pH, al analizar lo valores de cada clon élite en los dos estados de madurez, no se observa variación significativa, ni un comportamiento definido, así se observa un leve incremento o disminución a medida que pasa el tiempo de almacenamiento, sin embargo estos resultados se concatenan con el contenido de ácido cítrico en la pulpa, así si el pH disminuye, se concentra más la acidez, o viceversa, si el pH sube se presenta menos cantidad de ácido cítrico en la pulpa.

Relación de sabor y Vitamina C

La relación de sabor o madurez, no es definida para cada clon, así el clon élite 2 y el testigo, presenta un aumento de la relación de sabor conforme transcurre el tiempo, acción más prolongada para este almacenamiento con respecto al ambiente natural al observar los valores, mientras que los clones 5 y 8, en cambio presenta diminución, desde el inicio del almacenamiento, comportamiento que se

relaciona con el sabor ácido de la fruta. La vitamina C, en los clones élite estudiados en los dos estados de madurez, reporta tendencia equilibrada durante el almacenamiento, como se observa en el gráfico 10, sin embargo también se observa aumento en algunos períodos de almacenamiento, debido a la maduración de la fruta, mientras que en otros clones como el testigo y el clon élite 5, en la madurez de 50 %, es visible la disminución, debido a la degradación del ácido ascórbico.

Gráfico 10. Vitamina C, de los clones élite y el testigo durante la conservación en ambiente controlado



Color y pardeamiento de la pulpa: Respecto a la luminosidad de la pulpa, a pesar de que se presenta un decrecimiento, se aprecia que es menor con respecto al ambiente natural. En cuanto al parámetro a (rojo = a^+, verde = a^-), se observa que en los períodos de almacenamiento intermedios, tiende a bajar, lo que significa que el color verde disminuye, mientras que b (amarillo = b^+, azul = b^-), aumenta, es decir que le color amarillo aumenta, este cambio es más notable en la conservación al ambiente controlado que para el ambiente natural, y por lo tanto lo es para el espacio de color determinado mediante el ángulo Hue, en donde este es menor para el almacenamiento al ambiente natural y mayor en condiciones controladas, sin embargo permanece en el espacio de color entre amarillo y verde. Referente a la cromaticidad, se observa que es mayor para el almacenamiento al ambiente natural, que en el controlado, resultado que coincide con la luminosidad, ya que las pulpas más opacas son más intensas en color que las más claras. El pardeamiento de la pulpa, establecido a través del índice de oscurecimiento, aumenta a medida que pasa el tiempo de almacenamiento, sin embargo se observa que es mayor para el ambiente natural, lo cual demuestra que las condiciones ambientales de 17º C y 59 % de humedad relativa influyen en el pardeamiento de la pulpa.

Caracterización química y nutricional de los clones élite seleccionados y el testigo.

Cuadro 9. Caracterización química y nutricional de tres clones élite seleccionados y el testigo, la variedad iniap quitoense 2009.

ANÁLISIS	CLON T2	CLON T5	CLON T8	Variedad INIAP Quitoense-2009
pH*	3,32 ± 0,12	2,96 ± 0,02	2,93 ± 0,05	2,93 ± 0,05
Ac. titulable (% ác. cítrico)*	2,40 ± 0,25	2,51 ± 0,20	2,62 ± 0,08	2,62 ± 0,08
Sólidos solubles (ºBrix)*	9,11 ± 1,22	12,73 ± 0,12	12,60 ± 0,72	12,60 ± 0,72
Humedad (%)	89,87 ± 0,53	89,28 ± 0,47	89,43 ± 0,30	90,46 ± 0,08
Cenizas (%)	7,55 ± 0,04	5,40 ± 0,16	5,15 ± 0,01	6,20 ± 0,03

Extracto etéreo (%)		1,10 ± 0,01	0,49 ± 0,05	0,73 ± 0,04	1,11 0,01
Proteína (%)		10,15 ± 0,19	8,25 ± 0,06	8,51 ± 0,08	6,66 ± 0,04
Fibra (%)		11,23 ± 0,01	6,78 ± 0,02	5,17 ± 0,01	4,86 ± 0,03
Carbohidratos totales (%)		69,98 ± 0,21	79,09 ± 0,14	80,45 ± 0,05	81,18 ± 0,06
Azúcares totales (%)		26,22 ± 0,16	39,93 ± 0,26	26,52 ± 0,36	48,39 ± 0,81
Azúcares reductores (%)		14,51± 0,05	11,84 ± 0,03	16,19 ± 0,06	25,17 ± 0,01
Vitamina C (mg/100g)*		15,33	17,33	16,67	53,33
Polifenoles totales (mg/g)		13,41 ± 0,38	11,84± 0,03	16,19 ± 0,06	8,45 ± 0,06
Carotenoides totales (μg/g)		36,44 ± 0,32	17,55 ± 0,31	10,33 ± 0,13	13,27 ± 0,14
Minerales (ug/g)	**Calcio**	900	700	800	500
	Magnesio	2000	1700	1500	1300
	Fósforo	800	700	800	1000
	Potasio	37700	26500	24600	32400
	Sodio	500	400	200	500
	Hierro	25	6	5	11
	Zinc	13	12	12	16
	Manganeso	4	4	4	3
	Cobre	3	4	1	2

Base fresca, ± desviación estándar, n = 3 repeticiones

En el cuadro 9, se señalan los resultados de la caracterización química y nutricional de los clones élite seleccionados de naranjilla que fueron sometidos a los dos tipos de almacenamiento. Los valores se presentan en base seca para comparar los valores entre los cuatro clones élite, con excepción de pH, la acidez titulable y los sólidos solubles.

De acuerdo al análisis nutricional, se observa que la humedad entre los tres clones élite y el testigo, no tienen mucha variación ya que todos poseen valores muy similares, sin embargo el valor más alto lo posee la variedad INIAP Quitoense 2009.

Respecto a la proteína los valores más altos se registraron para os clones T2 y testigo con valores de 10,15% y 6,66%, valores que tienden a ser mayores según los reportados por Galvis y Herrera en el 2003, en los cuales se reporta 0,6%.

El contenido de minerales fue mayor en el clon élite 2, excepto en el fósforo y cobre. Cabe recalcar que el potasio, es el mineral más representativo en todos los cuatro clones elite analizados debido a que puede cubrir los requerimientos diarios, ya que según Fox 1989, reportado por Coello, 2008, los requerimientos diarios de potasio en la dieta humana son de 2 000 a 6 000 mg.día^{-1}.

De acuerdo al extracto etéreo, se encontró que la variedad INIAP Quitoense 2009 y el clon élite 2, poseen el mayor contenido de grasa, con valores de 1,11% y 1,10% respectivamente, pese a que estos valores son bajos, esos resultan ser mayores para los reportados por Corpoica en el 2002, en donde indican un valor de 0,17%.

En el caso de los carotenoides totales, precursor de la vitamina A, se observa notablemente que el clon élite 2, es superior con un valor de 36,44 μg/g respecto a los demás clones élite en estudio.

Tabla de color descriptiva

Las tablas de color son importantes para los productores, ya que a través de ellas, podrán conocer el índice óptimo de cosecha, el tiempo de vida poscosecha y la calidad de la fruta en cada estado de madurez, para los tres clones élite y el testigo de naranjilla seleccionados.

Mediante la tabla de color se encontró un aumento de los sólidos solubles, en todos los clones élite seleccionados desde el grado 0, cuando la fruta se encuentra madura fisiológicamente, hasta el grado 4, en donde la fruta se encuentra madura organolépticamente, así mismo se observa que la acidez, expresada como porcentaje de ácido cítrico, aumenta debido al desarrollo del sabor ácido, característico de la naranjilla. Respecto al pH, se encontró que este también disminuye conforme desarrolla la maduración de la fruta.

A continuación se presenta las tablas de color de los clones élite seleccionados y el testigo, en donde se señalan los índices de calidad más relevantes como son: los sólidos solubles, acidez y pH, para cada grado de madurez, en donde se detalla los cambios de color de la fruta al exterior exteriormente conforme se incrementa la madurez.

TABLA DE COLOR DE NARANJILLA
Cruzamiento
***Solanum quitoense variedad Baeza* x (*Solanum quitoense variedad dulce* x *Solanum vestissimum*)**

0	1	2	3	4

DESCRIPCIÓN DE LA TABLA DE COLOR							
PARÁMETROS	GRADOS DE MADUREZ					0	La fruta es completa verde oscura
	0	1	2	3	4	1	25% de color amarillo naranja
Sólidos solubles (°Brix)	9,73	10,20	13,00	13,08	13,77	2	50 % de color amarillo naranja
pH (adimensional)	3,54	3,36	3,27	3,17	2,99	3	75% de color amarillo naranja
Acidez (g.100g^{-1} a. cítrico)	2,41	2,53	2,57	2,60	2,66	4	100% de color amarillo naranja

TABLA DE COLOR DE NARANJILLA
Variedad INIAP Quitoense 2009 (*Solanum quitoense Lam.*)

0	1	2	3	4

DESCRIPCIÓN DE LA TABLA DE COLOR							
PARÁMETROS	GRADOS DE MADUREZ					0	La fruta es completa verde oscura
	0	1	2	3	4	1	25% de color amarillo naranja
Sólidos solubles (°Brix)	7,87	7,93	10,22	10,65	10,85	2	50 % de color amarillo naranja
pH (adimensional)	3,72	3,64	3,08	3,02	2,72	3	75% de color amarillo naranja
Acidez (g.100g^{-1} a. cítrico)	1,75	1,84	2,40	2,51	2,56	4	100% de color amarillo naranja

2.2.12.5. Conclusiones

- Se realizó el análisis físico-químico de trece clones élite y el testigo, la variedad INIAP Quitoense 2009, de donde se seleccionó a los mejores clones élite de naranjilla, a través de características similares que presentó el testigo descritas en el acápite de selección de la Fase I, resultando ser los clones T2, T5 y T8.

- El comportamiento del clon élite T2, correspondiente al cruzamiento *Solanum quitoense x Solanum vestissimum* en los estados de madurez de 50% y 75%, alcanzó condiciones óptimas de calidad hasta los 10 días y aceptables para el procesamiento hasta los 15 días, durante el almacenamiento al ambiente natural, mientras que para el almacenamiento bajo condiciones controladas, hasta los 20 días. .
- Bajo condiciones de ambiente natural, se encontró que el clon élite T5, que corresponde al cruce *Solanum quitoense variedad dulce x Solanum hyporhodium*, cosechado en 50% de madurez logra mantener apreciables características de calidad hasta los 10 días de almacenamiento y aceptables para procesamiento hasta los 20 días de almacenamiento, mientras que la fruta cosechada con 75% de madurez hasta los 15 días de almacenamiento. En cuanto al almacenamiento bajo condiciones controladas, tuvo una duración hasta los 20 días de almacenamiento.
- El clon élite T8 correspondiente al clon élite *Solanum quitoense* variedad Baeza x (*Solanum quitoense* variedad dulce x *Solanum vestissimum*), cosechado en 50 y 75% de madurez presentaron características de calidad hasta los 10 días de almacenamiento bajo condiciones del ambiente natural, mientras que para el ambiente controlado hasta los 20 días de almacenada la fruta.
- El testigo durante el almacenamiento al ambiente, cosechado a 50% de madurez, tuvo una duración con características óptimas hasta los 15 días, mientras que cosechada con 75% de madurez, mantuvo condiciones de calidad hasta los 20 días. Para el almacenamiento al ambiente controlado, presentó características de calidad hasta los 20 días en los dos estados de madurez.
- Se elaboró la tabla de color con los contenidos de sólidos solubles, acidez y pH, con la descripción de cada grado de madurez. Estas tablas son una herramienta de trabajo para el productor ecuatoriano, con el fin de dar pautas respecto a la calidad de la fruta en los diferentes estados de madurez, que le servirán de ayuda para programar las actividades de cosecha y comercialización de la fruta.
- Según el análisis nutricional, el clon élite 2, que corresponde al cruzamiento *Solanum quitoense x Solanum vestissimum* en la madurez comestible, presentó el mayor contenido de cenizas con 7,55%, extracto etéreo 1,10 %, proteína 10,15 %, fibra 11,23 %, humedad 89,87 %, Ca 900 ug/g, Mg 2000 ug/g, P 800 ug/g, K 37700 ug/g, Na 500 ug/g, Mn 4 ug/g.
- De acuerdo al estudio de la caracterización física, se tomó en cuenta las especificaciones de la fruta para la exportación como el peso y las medidas del diámetro, los clones que reunieron estas características fueron el T2, T5 y T8, los cuales presentan características a las del testigo, variedad INIAP Quitoense 2009. Estos clones presentaron valores altos de peso, largo, diámetro, relación L/D apropiada, rendimiento en pulpa, por lo que se ubicaron en los primeros grupos estadísticos en la prueba de Tukey. Referente a la firmeza y la consistencia, los resultados señalan que tienen valores bajos de firmeza y consistencia más líquida en comparación al testigo.

- Respecto a la caracterización físico-química los clones elites T2, T5 y T8, presentaron valores óptimos de sólidos solubles y acidez, datos comprobados mediante la prueba de Tukey al 5%, al situarse en los primeros rangos estadísticos, que se relaciona con los datos de la relación de sabor.
- Referente al color, los clones élites T2, T5 y T8, resultaron tener bajos incrementos del índice de oscurecimiento, así como también presentaron condiciones adecuadas de luminosidad, espacio de color (° Hue) y cromaticidad.
- Acorde al análisis sensorial, mediante la prueba de aceptación proporcionada por los catadores los clones élite T2, T5 y T8, coincidieron con las más altas puntuaciones para la prueba de aceptabilidad y mejores características en cuanto a la calidad física y química.
- Durante el almacenamiento al ambiente natural a 17° C y 59 % de humedad relativa, la firmeza es inversamente proporcional con respecto a los estado de madurez y al tiempo de almacenamiento, es decir baja la firmeza conforme aumenta la madurez de la fruta y los días de almacenamiento. En los 10 días de almacenamiento se registra que la firmeza disminuye a la mitad, el clon élite T8, es el que resultó ser el más firme luego del testigo en los estado de madurez.
- En los dos tipos de almacenamientos los sólidos solubles aumentan con el proceso de maduración de los dos estados de madurez, mientras que la acidez indica tendencia decreciente, proceso debido a la degradación de los ácidos orgánicos; por lo que la curva de la relación de sabor aumenta.
- La pérdida de peso es menor cuando se almacena en condiciones de refrigeración, esto es a 8° C y 90% de humedad relativa, permitiendo conservar la calidad del fruto por un período mayor respecto al almacenamiento en condiciones ambientales.

2.2.13. Evaluación agronómica de materiales de lulo *Solanum sp*, frutal de alto potencial para zonas tropicales[30].

Objetivo del Proyecto (1): *"Con la participación de agricultores, empresas comercializadoras y procesadoras seleccionar materiales élite de lulo y mora, con criterios de adaptabilidad, resistencia a enfermedades, productividad y aceptación del mercado"*

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

[30] Muñoz, L.A. Investigador CIAT, Programa de Frutas Tropicales.

2.2.13.1. Objetivos

Objetivo General

Identificar materiales aptos para mercado o para iniciar procesos de mejoramiento a partir de la evaluación de caracteres agronómicos y de calidad de fruta.

Objetivos Específicos

- Realizar una evaluación agronómica de materiales de lulo en dos localidades con el fin de identificar genotipos y caracteres agronómicos de interés para el mejoramiento genético de este frutal.
- Ajustar metodologías para orientar la selección y evaluación de materiales de lulo.

2.2.13.2. Marco Referencial

El cultivo de lulo *Solanum quitoense* es de ciclo corto, genera ingresos semanales, factor que estabiliza la economía familiar. Es un frutal con mercados importantes en Colombia y Ecuador, y de interés para mercados internacionales. En Colombia es un factor esencial en la economía familiar campesina, constituye la principal fuente de ingresos para cerca de 12.000 familias en Colombia y otras 19.000 en Ecuador (Fontagro 2006). Este cultivo es generador de empleo y desarrollo industrial para jugos y pulpas, pero es evidente el déficit en la oferta del producto. La atención del sector industrial está focalizada en el lulo “la Selva’’ único cultivar reconocido en el país, por otro lado la producción nacional para mercado fresco está determinada por el lulo Castilla; este material tiene características organolépticas muy apetecidas pero altamente variable en calidad, principalmente debido a la falta de tecnologías como variedades y a un manejo agronómico aceptable y sostenible.

Aunque se han realizado esfuerzos por colectar y caracterizar materiales no se ha realizado una búsqueda de materiales con diversos intereses desde comerciales hasta la identificación de materiales con potencial para ser incluidos en programas de mejoramiento. En síntesis, el mejoramiento genético del lulo, buscando resistencia a enfermedades, calidad de fruta y otros atributos agronómicos genera una oportunidad de contribuir al desarrollo del cultivo de lulo en Colombia y en otros países productores (Estrada 1992). Este trabajo identificó materiales sobresalientes por características de interés comercial o de mejoramiento y desarrolló herramientas de evaluación de los mismos, las cuales permiten acortar la brecha tecnológica.

2.2.13.3. Metodología

El material vegetal utilizado correspondió a las 32 accesiones colectadas por CIAT, con la participación de productores, en los departamentos del Cauca, Valle del Cauca, Caldas y Risaralda (tabla 1), 4 materiales del banco Nacional de

Semillas, 5 híbridos interespecíficos en proceso de evaluación por parte de Corpoica (tabla 2) y como materiales comerciales de referencia, el híbrido La Selva liberado por Corpoica y el material “Larga Vida” desarrollado por el señor Marcelino Bolaños.

Tabla 1. Listado de materiales evaluados.

Código	Productor	Lugar de origen	Tipo de material
WM-E1	Wilson Moriones	Pescador - Cauca	Castilla
DP-E1	Diomar Patiño		
DP-E2			
PH-E1	Pedro Herrera		
PH-SI			
VM-E1	Vitelio Menza		
VM-E2			
SS-E1	Saul Salazar	Tierradentro - Cauca	
SS-E2			
JY-E1	José Lisandro Yonda		
OJV-E1	Orlando y José Valverde		
EC 28	Material original de CEFA, siembra y selección de individuos por Lentini Z, et al.	Dapa - Valle del Cauca	Desconocido (Corpoica sugiere que pueden ser segregantes de "la Selva")
EC 39			
ER 10			
ER 19			
SEC 27			
SEC 31			
SER 15			
SER 7			
SER 9			
YD - S1	Yolanda Diaz Baena	Tuluá - Valle del Cauca	Castilla
YD - E2			
YD - E3			
JS - E1	Jorge Solarte	Darien Valle del Cauca	
JS - E2			
JS - E3			
LH-E1	Luis Henrriquez		
FG-E1	Fersaín García		
AG - E1	Abelardo Gutierrez	Santa Rosa de Cabal - Risaralda	
AG - E2			
OR -E1	Olga Rendón Grisales		
OR -E2			
120043	Semilla Sexual del Banco Nacional de Semillas en Corpoica	Valle del Cauca	Castilla
120044		Nariño	
120052		Cauca	
120055		Huila	
Jalisco	Híbridos Corpoica la Selva	Corpoica	Hibridos
La Selva			
MB-E1	Marcelino Bolaños	Ginebra - Valle del Cauca	Castilla

Tabla 2. Parentales de los clones derivados de hibridación interespecífica, *S. hirtum* X *S. quitoense*.

Genotipo	Padres	Especie	Origen del Material
PL 8	ILS 3260	*S quitoense*	Aguas Claras Timba Cauca 3º 08 76º 42 1850 msnm
	ILS 3223	*S hirtum*	Rionegro Santander la Suiza.
PL 11	ILS 3262	*S quitoense*	Valle 63 Timbita Cauca 3º 07 76º39 2100 msnm
	ILS 3234	*S hirtum*	Aguas calientes, Santander. (híbrido espontáneo con *S. quitoense*)
PL 19	ILS 3222	*S quitoense*	Cauca Vereda Juntas, Popayán. Latitud 2,30 long 77,06 1860 msnm *S. quitoense*.
	ILS 3234	*S hirtum*	Aguas calientes, Santander. (híbrido espontáneo con *S. quitoense*)
PL 24	ILS 3216	*S quitoense*	San Antonio Sibundoy, Putumayo. Latitud 1,11 long 76,55 2110 msnm.
	ILS 3234	*S hirtum*	Aguas Calientes, Santander (híbrido espontáneo con *S. quitoense*)
PL 35	ILS 3260	*S quitoense*	Aguas Claras Timba, Cauca 1850 msnm S. Q
	ILS 3223	*S hirtum*	Rionegro Santander la Suiza.

Estos materiales fueron introducidos a condiciones *in vitro* y propagados siguiendo el protocolo adaptado por (Lentini *et al* 2005). Estas plantas fueron establecidas en dos parcelas para evaluación, una en Cauca municipio de Popayán y otra en Risaralda municipio de Santa Rosa de Cabal figura 1A, B y C. El CIAT codificó los materiales de acuerdo con el nombre del productor, la presencia de espinas o no y un número si fueron una o más selecciones por productor.

En el departamento del Cauca la parcela se estableció en el Parque Temático Industrial de la Universidad de Cauca, en la vereda “La Rejoya", ubicada, a 7 kilómetros nor-occidente de la ciudad de Popayán con coordenadas geográficas 2° 29’ 55,6” Latitud Norte, 76° 34’ 58,1” Longitud Oeste; a una altura de 1800 metros sobre el nivel del mar, temperatura promedia de 18°C y precipitación promedio anual de 1750mm, (Vivas y Morales, 2005). Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones (Figura 1).

En Risaralda la parcela se estableció en la granja La María, propiedad de la Universidad de Santa Rosa de Cabal, localizada en la vereda el Manzanillo municipio de Santa Rosa de Cabal. Las coordenadas geográficas del área de estudio corresponden a: latitud N 4° 53' 45,6” y longitud W 75° 37' 59.3”; pertenece a la micro cuenca del río San Eugenio. Las condiciones meteorológicas de la zona de estudio son: 1600 m.s.n.m, temperatura media de 19,5°C, precipitación de 2.308 mm/anuales, humedad relativa de 80,73 %, brillo solar de 3,85 horas luz día. El diseño experimental fue de bloques completos al azar, con 4 repeticiones, la unidad experimental estuvo compuesta por 5 plantas, cada bloque contó con un área de 974.6 m², las plantas se sembraron en triángulo con distancias de 3 m entre plantas y 3 m entre surcos (Figura 2). En las dos localidades se realizó un

levantamiento topográfico con curvas a nivel, información con la cual se elaboraron planos de campo y se organizaron los bloques del diseño experimental.

Figura 1. Diseño de la parcela en Popayán.

Figura 2. Diseño de la parcela en Santa Rosa de Cabal.

Se evaluaron los materiales en cinco aspectos básicos:

1. Evaluación de crecimiento y fenología
2. Evaluación de rendimiento y calidad de fruto.
3. Evaluación de incidencia de tres enfermedades.
4. Evaluación participativa con productores sobre el comportamiento agronómico.
5. Evaluación de aceptación por la industria.
6. Evaluación de crecimiento y fenología

Para la evaluación de Incidencia de las principales enfermedades en las dos localidades, se aplicó un plan de manejo limpio del cultivo. Se registró fotográficamente la sintomatología observada. Para una adecuada identificación de patógenos en campo, se realizó una comparación con registros bibliográficos sobre síntomas, signos, y forma de distribución en el cultivo, además del acompañamiento de patólogos expertos como Germán Llano del CIAT. Se calculó el porcentaje de incidencia para *Phytophthora, Cladosporium y Colletotrichum* sp.

Evaluación participativa con productores

Se adaptó la metodología de identificación de criterios, calificaciones y razones[31], para identificar las características observadas por los productores al momento de seleccionar materiales en campo, cuantificar esta característica y documentar la razón por la cual es un carácter importante para ellos.

Se seleccionaron las cadenas de lulo en Belén de Umbría (Risaralda) (producción industrial) y Pitalito (Huila) (mercado fresco). (Tabla 3).

Tabla 3. Eslabones y actores a consultar.

Eslabón de la cadena	Actor	Participantes
Producción	Líderes de Productores de la Asociación, Productores innovadores.	30
Servicios de apoyo	Asistentes técnicos, Casas comerciales proveedoras de insumos, Transportadores, viveristas y Comercializadores	11
Oferentes de tecnología	ICA, Sena, Universidad Santa Rosa de Cabal.	3
Instituciones y ONG's	Representantes de la Alcaldía, Centro Provincial del Sur del Huila – Agrosur. Pitalito Huila	11

Para el análisis se realizó una tabla de frecuencias y un análisis de regresión logística, finalmente se realizó una clasificación por los dos principales criterios de selección.

Evaluación de aceptación por la industria.

Se realizó con las empresas: Productora de Jugos S.A. en Tuluá Valle del Cauca y Casa Luker en Manizales Caldas, y en sus laboratorios se evaluaron los materiales bajo sus estándares de calidad y aceptación de fruta (figura 3).

[31] Metodología CIAT (Hernández 2009)

Figura 3. Encuentro con los actores de las cadenas para definición de criterios de evaluación.

2.2.13.4. Resultados y Discusión

Posterior a la propagación *in vitro* y a la aclimatización realizada en CIAT, las plantas fueron llevadas a las dos localidades, fueron mantenidas en vivero hasta el momento de la siembra. En este periodo los materiales presentaron diferencias a la presión por enfermedades, los clones más afectados fueron: **DP-E1, PH-S1, WM-E1, SER-7, OJV-E1.** Estos materiales fueron llevados nuevamente, para establecer los ensayos en campo y lograr información sobre las características de frutos y otros aspectos agronómicos.

En las dos localidades, se encontraron diferencias significativas para altura de planta entre materiales, estas pueden estar causadas por variabilidad genética, efecto ambiental y la interacción genotipo por ambiente Para cada localidad se identificaron los materiales que presentaron mayor y menor crecimiento: FGE1 y PHE1 en Santa Rosa, SEC31 y ORE1 en Popayán.

En las dos localidades los materiales 120053 y el JS-E3, presentaron porte alto, DPE2, EC39, ER10, ER19, PHE1, PHS1, PL24 Y VME1 presentaron porte bajo. Los materiales restantes presentaron un porte diferente. Es interesante notar que los híbridos PL11 y 35 así como los materiales SEC y SER aparentemente híbridos, presentan porte bajo en Santa Rosa y porte alto en Popayán.

Con relación a la duración de las etapas de desarrollo a inicio de floración, cuajado y cosecha, se obtuvo lo siguiente del promedio de materiales: En Popayán días a floración fue 90, a cuajado 164 y a cosecha 280 días, mientras que en Santa Rosa días a floración fue de 63, a Cuajado 139 e inicio de cosecha 239 días. Lo cual pone en evidencia que los planes de manejo de enfermedades y de fertilización deben ajustarse a los periodos de tiempo en cada localidad.

En las dos localidades se encontraron diferencias significativas entre materiales para los días a cada fase de desarrollo. Así en Santa Rosa, el material SER-9 que aparentemente corresponde a un derivado de la selva (Corpoica), presentó el menor tiempo a floración con 31 días, mientras los materiales castilla ER-10 y VM-

E1 presentaron el mayor tiempo a inicio de floración, con más de 82 días. Los híbridos PL11 y PL24 presentaron el menor tiempo para inicio de cosecha con menos de 146 días, mientras que los materiales castilla PH-E1 y SS-E2 iniciaron cosecha luego de los 318 días de siembra, 5.7 meses de diferencia.

La figura 4, presenta grupos de materiales con características de precocidad en floración y cosecha como los materiales SER9, SEC31 Y SSE2 entre otros, en Popayán y materiales tardíos para la misma localidad AGE1, ORE1, 120043, 44, 52 y 55. En Santa Rosa (figura 5) no se encontró correlación entre días a floración y días a cosecha, sin embargo se identificaron materiales precoces como PL11 y SEC27 y tardíos como VME2 y ER10.

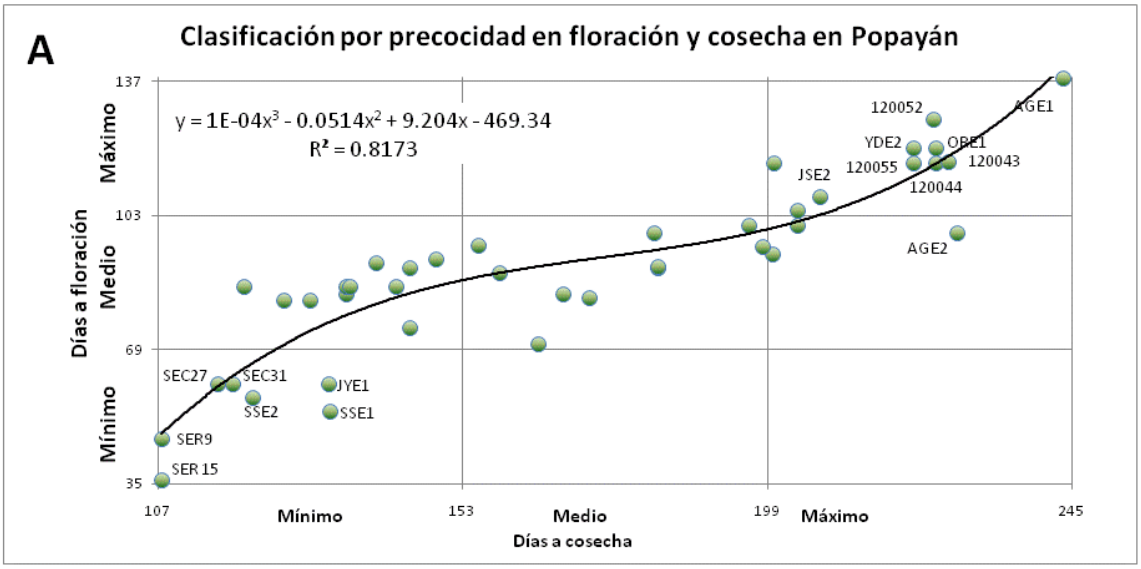


Figura 4. Clasificación de materiales según días a floración y días a cosecha en Popayán

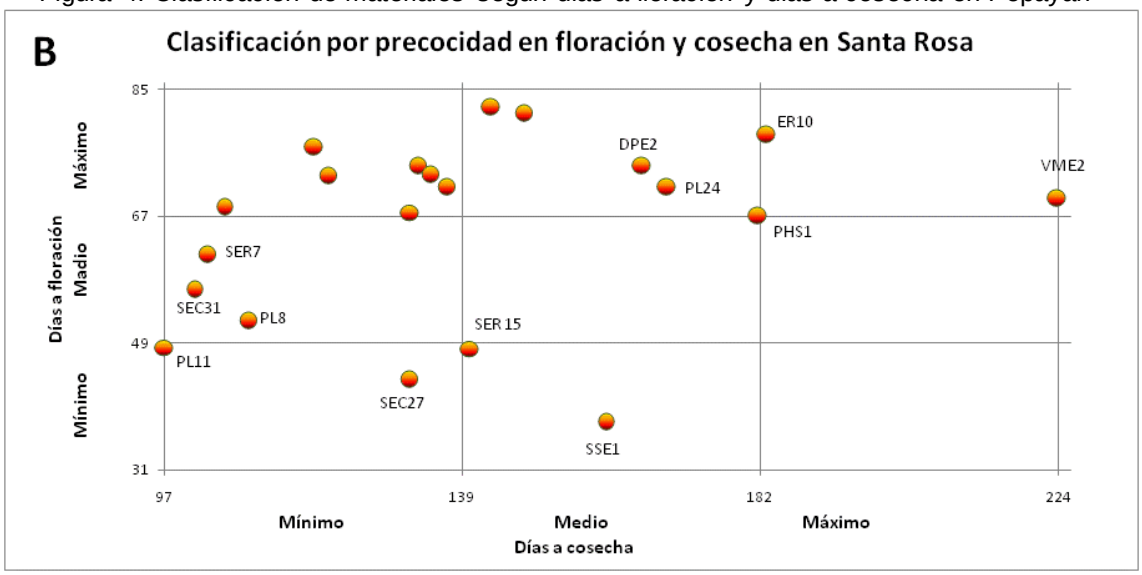


Figura 5. Clasificación de materiales según días a floración y días a cosecha en Santa Rosa de Cabal

En las dos localidades los materiales SER9 y SSE1 presentaron el menor tiempo con menos de 53 días, mientras que el material AGE1 en Popayán tardó cerca de 138 días. Los días a inicio de cosecha, varió desde 108 días hasta 244 en Popayán y de 97 hasta 266 en Santa Rosa. Para esta característica no se observan grupos de materiales por tipo Castilla o híbridos.

El tamaño y peso del fruto son las características más relevantes para todos los actores de la cadena del lulo y en general, el peso del fruto de los materiales evaluados, está constituido en un 58% por pulpa y un 42% por cáscara y semillas, (Figura 6). El mejoramiento debe buscar el aumento en la relación pulpa / desecho, para que los materiales sean aceptados por los diferentes mercados.

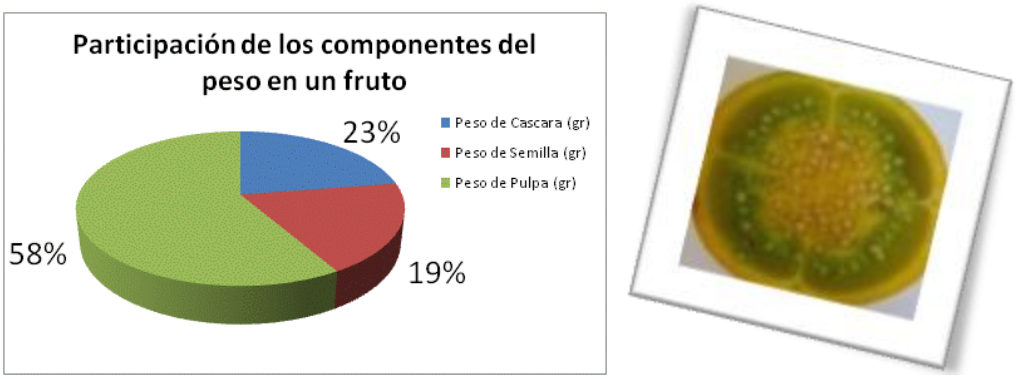


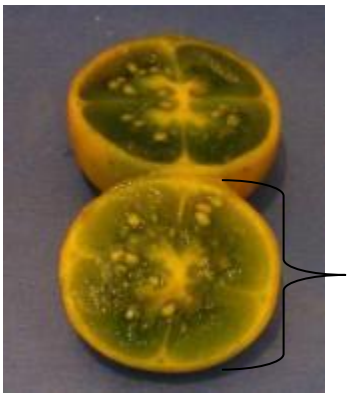
Figura 6. Participación general de los componentes del peso en un fruto de lulo.

Los materiales YD-E3 y JS-E1 presentaron el mayor peso promedio, con más de 120 gr/fruto y 6.2 cm de diámetro, mientras los materiales: SER-7, PL-35, PL-8 y PL-11, presentaron el menor peso promedio con menos de 25 gr/fruto y 4.0 cm de diámetro.

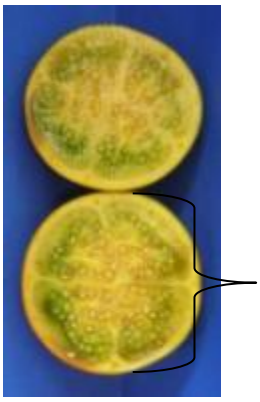
Según los productores sólo los materiales que están por encima de 100 gr/fruto son aceptados por el mercado de consumo fresco, en nuestro caso siete materiales cumplen esta condición, incluido el material MGB1, que corresponde con el material comercial Larga vida desarrollado por el señor Marcelino Bolaños. Para la industria frutos con más de 50 gr/fruto son aceptados. Del grupo de materiales evaluados veinticinco cumplen con esta característica, Sin embargo deben cumplir con otras características de calidad.

Se encontró una relación directa entre peso y tamaño de fruta, R^2 0,94, Igualmente existe una correlación positiva del peso del fruto con cada uno de sus componentes (peso de cascara, pulpa y semillas), con R^2 superiores a 0.75. Los 4 materiales con mayor peso presentan en promedio un 18,5% de cáscara y los materiales PH-SI, SS-E2 y SER-7 presentan más del 30% de cáscara, resultando en una característica poco deseada para la industria pero muy interesante para los comercializadores que buscan una mayor resistencia a manipulación.

Así que para la selección de materiales, que podrían tener un mercado específico, por ejemplo se podría pensar entonces que los PL por tener resistencia a enfermedades y buen porcentaje de pulpa serían de interés para la industria, pero el color de la pulpa no es el adecuado, sería más interesante mejorar el SER7 por tamaño de fruto, sabiendo es este material presentó una tolerancia media a las enfermedades o sería un aspecto más controlable, con manejo agronómico, que el color de la pulpa o el tamaño del fruto (Figura 7).



Corte trasversal de fruto SER7



Corte trasversal de fruto JSE1

Figura 7. Tamaño de fruto y proporción de pulpa - corte transversal de frutos.

Los híbridos PL-8, PL-11 Y PL35, presentaron el mayor rendimiento en kg/parcela, los materiales que presentaron menor rendimiento fueron ORE1, JSE1 y el testigo comercial MBG1. Es importante anotar que los materiales híbridos iniciaron producción dos a tres meses antes y permanecieron con una carga óptima hasta después de 18 meses de cosecha, (Figura 8).

Con el rendimiento de algunos híbridos de Corpoica y Materiales como el SEC31, además de su alto % de pulpa y características de tolerancia a enfermedades, hacen de estos materiales muy interesantes para sistemas de producción de fruta para industria, debido a que estas características aumentarían la rentabilidad del productor con un producto de bajo costo como la requiere la industria. Sería necesario replantear los requerimientos de la industria en cuanto a tamaño y seguramente hacer ajustes en maquinaria para que sean capaces de procesar esta fruta.

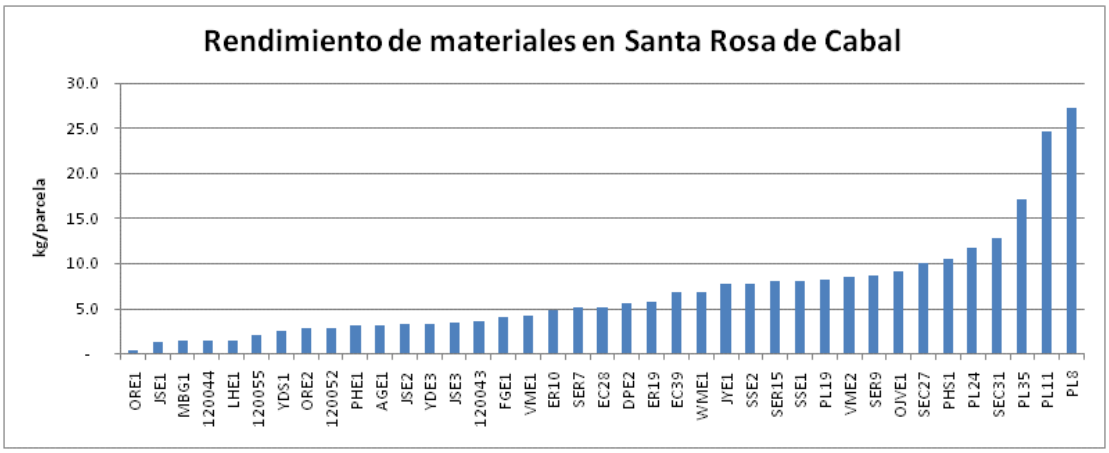


Figura 8. Rendimiento de materiales en Santa Rosa.

El pH de los materiales evaluados varió de 2.46 para el ORE2 a 3.58 para el PL24. Los grados Brix variaron desde 5.6 para el VME2 a 12.9 para el PL11. Los materiales híbridos PL mostraron los valores de ^{o}Brix más altos, superiores a 10.7, excepto el PL-8, junto con los materiales aparentemente híbridos SER-9, SEC-27 y SEC-31. Los materiales con más bajo ^{o}Brix fueron: VM-E2 Y EC-39.

Los materiales con valores superiores a 9.0 ^{o}Brix y con color de pulpa verde, serían aceptados por la industria en este caso el SEC31 y SER15 cumplen estos requisitos, dentro de los materiales con color de pulpa Verde-Amarillo y ^{o}Brix superiores a 9.0, se encuentra PHE1 y EC28 tipo Castilla y los SEC27 y SER9 aparentemente híbridos.

Los atributos deseables en el fruto, no están estrictamente ligados a un solo carácter, y se debe tener en cuenta la combinación de los mismos para lograr aceptación en diferentes mercados.

Incidencia de las principales enfermedades

En Popayán por las condiciones climáticas y el manejo adoptado en el primer lote, se observó una incidencia del 70% de *Phytohpthora* (figura 9 y 10), en los primeros meses del cultivo, mientras que en Santa Rosa sólo apareció en los meses marzo y abril en el material PL11 y en mayo para los materiales DP-E2, SER-9 y PL-8.

En Popayán la enfermedad se presentó de forma general al tener 19 ^{o}C y 75% HR. En Santa Rosa la incidencia de este patógeno se presentó cuando se dio alta precipitación luego de un periodo seco. En Santa Rosa se pasó de 200 a 400 mm de lluvia en los meses que se presentó la enfermedad.

Figura 9. Síntomas de *Phytopthora* en tallo

Figura 10. Cicatrización con pasta de cobre.

En Popayán, sobre el lote que presentó alta incidencia de gota, se pudo evaluar el grado de severidad sobre diferentes tejidos de la planta, siendo los tallos principales, hojas y frutos los más afectados (Figura 11). En Popayán una vez realizados los correctivos al plan de manejo, aplicando un método temprano de monitoreo de la enfermedad y aplicando a tiempo prácticas preventivas, esta enfermedad dejó de ser limitante en esta localidad. Agricultores expertos, comentan que esta enfermedad es controlable siempre que se conozcan los fenómenos climáticos que la pueden desencadenar, los síntomas iníciales y las prácticas preventivas adecuadas.

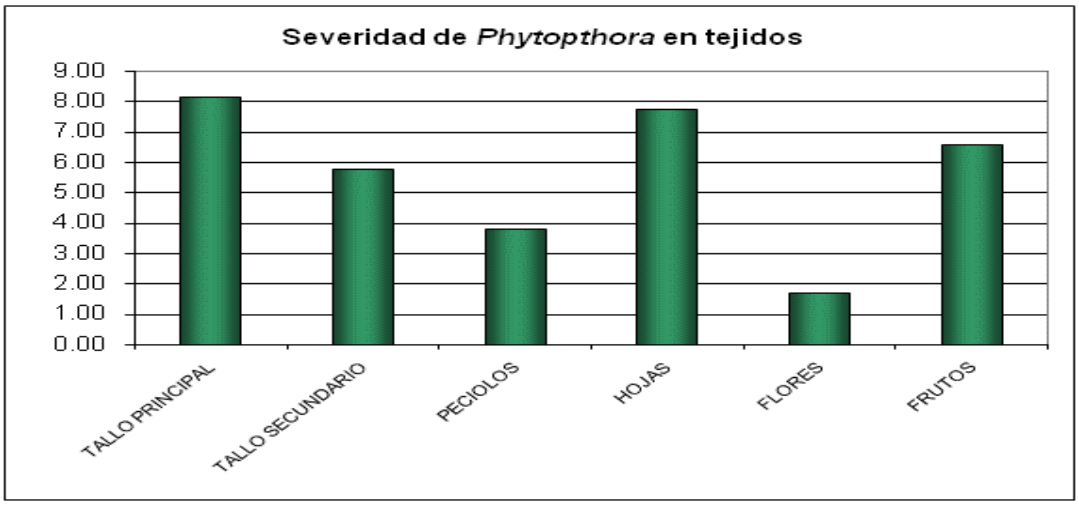


Figura 11. Severidad evaluada sobre diferentes tejidos en Popayán.

Se encontraron diferencias significativas entre materiales, para la incidencia de *Cladosporium*. En general, los híbridos PL fueron los materiales con menor incidencia durante toda la evaluación, en las dos localidades con menos del 25%, valor que está por debajo del umbral de daño económico (Zuleta, 2006). Los materiales que presentaron una mayor incidencia fueron diferentes para las dos localidades: OR-E1 y 2, 120043 y 55 y FGE1 y MB-G1 en Santa Rosa con 100% y PH-E1, SEC-31, SER-15 y SS-E1 en Popayán con menos del 70% (Figura 12).

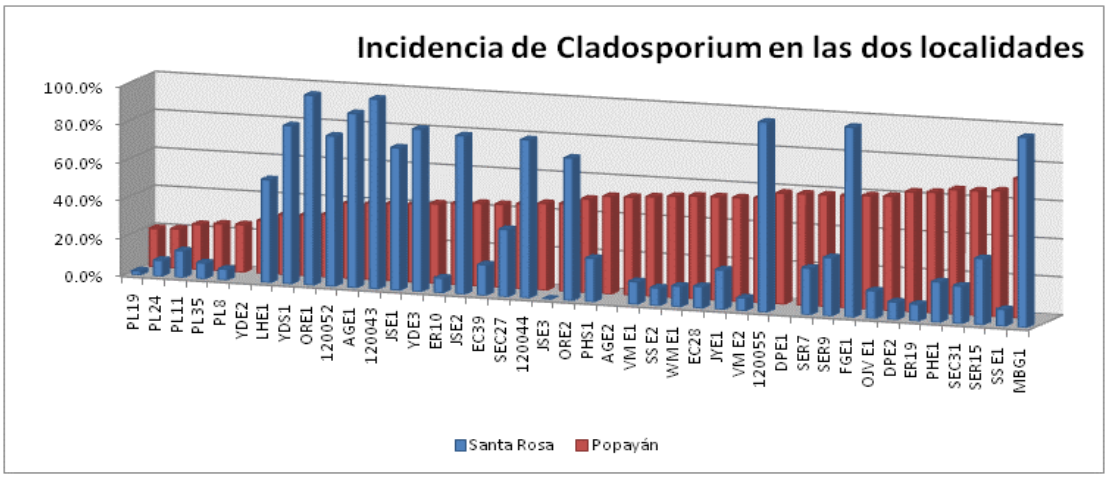


Figura 12. Incidencia de *Cladosporium* sp., en las dos localidades.

Con relación a Antracnosis (*Colletotrichum sp*), se observó una clara diferenciación en materiales con alta incidencia en hojas, tallos y frutos, mientras otros sólo presentan la enfermedad en tallos y hojas. A la derecha en la figura 13, se observan seis materiales que no presentaron esta enfermedad durante todo el tiempo ni en ninguna de las partes evaluadas, resulta interesante que entre estos materiales encontremos tres híbridos (PL 11,19 y 24) y tres materiales tipo castilla (JYE1, SSE2 y JSE2).

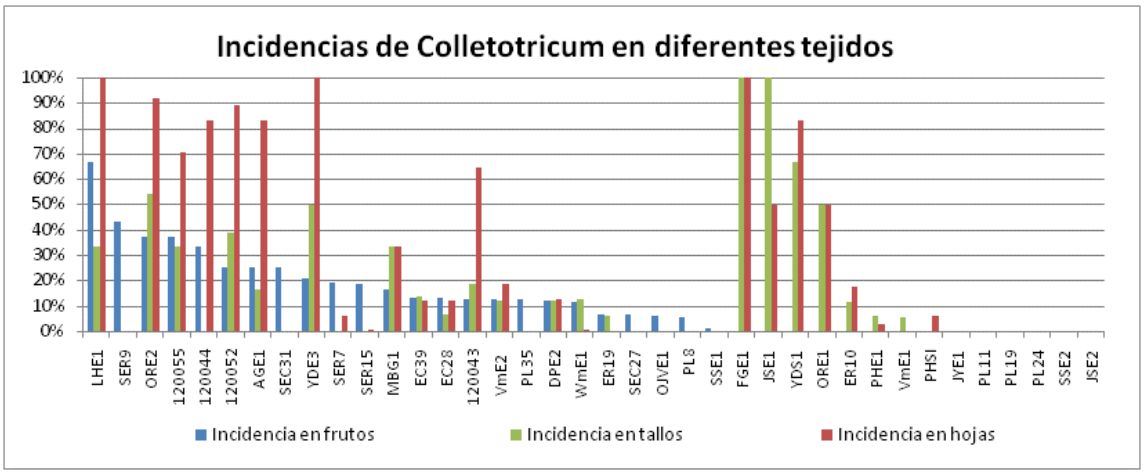


Figura 13, Incidencia de *Colletotrichum* sp en frutos, tallos y hojas.

Evaluación participativa de materiales en campo

Se identificó los criterios de selección, de materiales de lulo, para los diferentes actores de la cadena (Tablas 4 y 5). La metodología aumenta las probabilidades de adopción de los materiales ya que está enfocada a suplir las necesidades puntuales de todos los beneficiarios a lo largo de la cadena (Figuras 14 y 15).

Uno de los aspectos clave en el proceso de selección de materiales después que se ha levantado la información de los actores de la cadena, es el acceso a la

información de determinados caracteres en los bancos de germoplasma, para los materiales allí conservados. Si no se cuenta con esta información, el banco no estará cumpliendo su función de servir de fuente de material para fines comerciales o de procesos de mejoramiento con una orientación al mercado.

Con base en encuestas abiertas y el número de veces que los criterios fueron mencionados, se obtuvo un listado frecuencias de los criterios, la cual sirve de derrotero para procesos de mejoramiento y selección, (Figura 16). Con esta información se podrán elaborar libros de campo para la evaluación posterior de materiales de lulo en procesos de evaluación participativa.

Fue claro que los productores tienen muchos criterios > 30 pero aceptan que los materiales no cumplan con todos ellos, por su parte los comercializadores y la industria no tienen más de 5 criterios, pero se deben cumplir todos para aceptar el material.

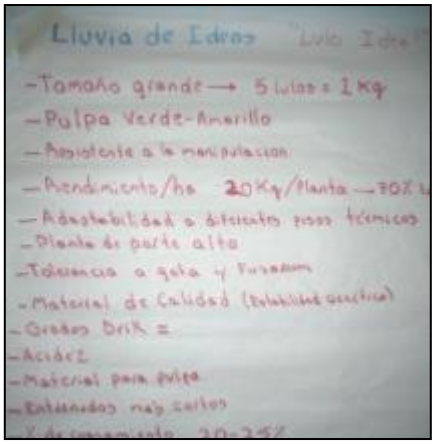


Figura 14. Método de lluvia de ideas para la obtención de criterios.

Figura 15. Descripción del formato de evaluación en campo de materiales – al grupo de productores

CRITERIO	NÚMERO	%
Susceptible a plagas y enf	62	16.4%
Tamaño de fruto	57	15.0%
Arquitectura de planta	46	12.1%
Carga	31	8.2%
Porte de planta	27	7.1%
Cuajamiento	23	6.1%
Sabor	20	5.3%
Grosor de tallo	20	5.3%
Espinas en tallo	12	3.2%
Area foliar	11	2.9%
Color de fruto	10	2.6%
Desarrollo planta	6	1.6%
Color de pulpa	6	1.6%
Aroma	6	1.6%
Pistilo	5	1.3%
Cantidad de semilla	5	1.3%
Floración	4	1.1%
Dulzura	4	1.1%
Tricomas en fruto	3	0.8%
Ramas productivas	3	0.8%
Vigor	2	0.5%
Rajamiento de fruto	2	0.5%
Numero de ramas	2	0.5%
Espesor de cascara	2	0.5%
Caida de fruto	2	0.5%
Pedunculo	1	0.3%
Número de ramas	1	0.3%
Numero de chupones	1	0.3%
Largo de entrenudos	1	0.3%
Desprendimiento de tricom	1	0.3%
Color de hojas	1	0.3%
Caida de hojas	1	0.3%
Altura de planta	1	0.3%
Gran Total	**379**	**100.0%**

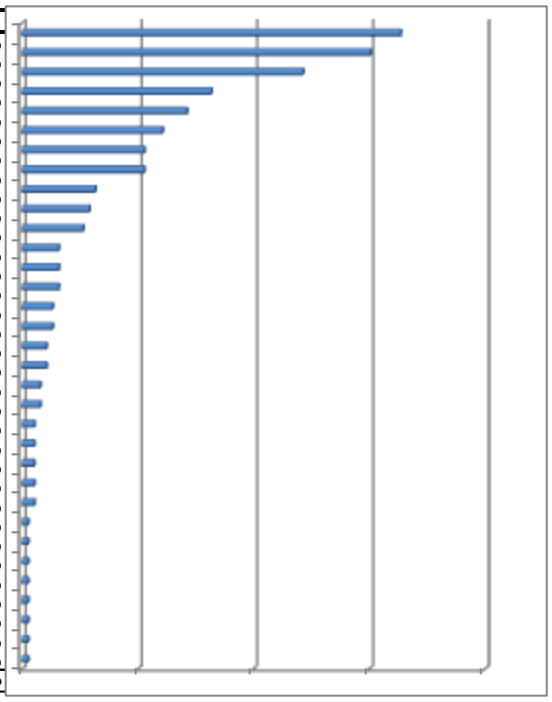
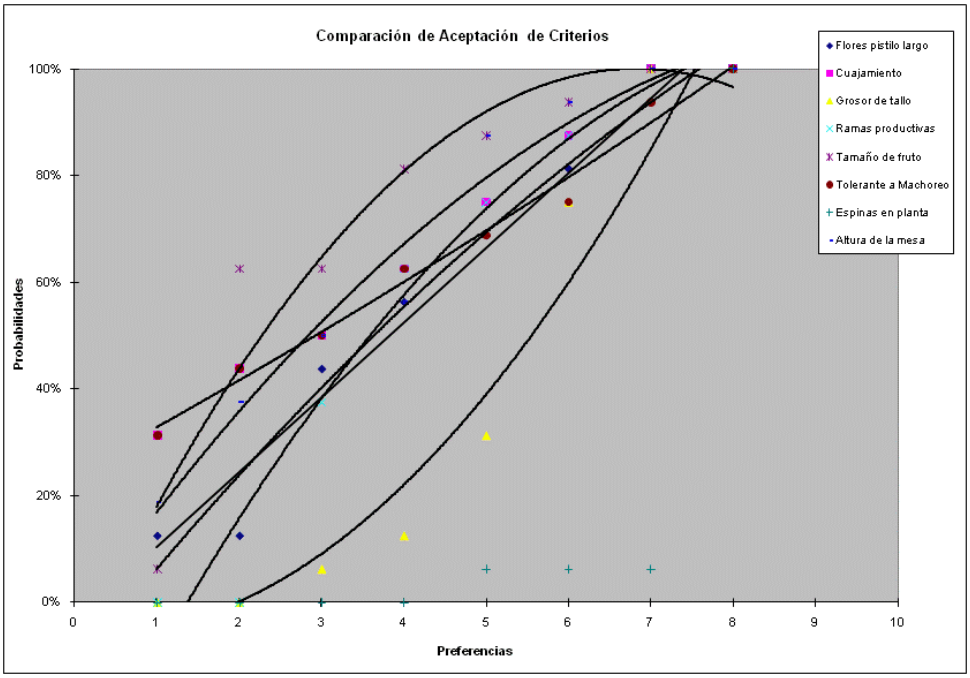


Figura 16. Listado de criterios mencionados por productores

Se pidió a 16 productores que realizaran un orden de preferencia para diez de los criterios identificados, con el fin de confirmar cuales son los más determinantes a la hora de seleccionar materiales. Con base en un análisis de regresión logística (Hernández 2009), se identificó que los criterios con más probabilidad de quedar en los primeros lugares del ordenamiento son: Tamaño del fruto, resistente a machorreo, altura de la mesa y cuajamiento, pero sólo el último es confirmado gracias al estadístico de prueba Chi cuadrado (Figura 17).

Este resultado verifica las frecuencias en cuanto al tamaño de fruto, arquitectura de planta y de alguna manera la resistencia a enfermedades, que en este caso se hizo énfasis en machorreo por presentar alta incidencia en la época de la evaluación; en este ejercicio los productores prefirieron dejar por fuera la característica de resistencia a enfermedades pues consideraron que es algo que pueden corregir con manejo pero las otras características no, se aceptó para fines del ejercicio a pesar de tener claro que el carácter de tolerancia o resistencia a enfermedades podría encontrarse definido genéticamente.



Creterio	Parámetro estimado b (intercepto)	Error estándar Sb	Wald Chi-Square	Chi Square	La significancia de las diferencias estadísticas está basada en una aceptación hasta del 15%	
Flores pistilo largo	-0.035714286	0.0549	0.6508	0.4198	Intercepto negativo	No difiere
Cuajamiento	0.212053571	0.0279	7.5872	0.0059	Intercepto positivo	** Difiere estadísticamente
Grosor de tallo	-0.357142857	0.1235	2.8924	0.0890	Intercepto negativo	** Difiere estadísticamente
Ramas productivas	-0.151785714	0.0903	1.6813	0.1948	Intercepto negativo	No difiere
Tamaño de fruto	0.236607143	0.1244	1.9019	0.1679	Intercepto positivo	No difiere
Tolerante a Machoreo	0.220982143	0.0236	9.3779	0.0022	Intercepto positivo	** Difiere estadísticamente
Espinas en planta	-0.256696429	0.2238	1.1469	0.2842	Intercepto negativo	No difiere
Altura de la mesa	0.120535714	0.0655	1.8390	0.1751	Intercepto positivo	No difiere

Figura 17. Regresión logística para diez criterios ordenados por productores.

Una pendiente alta con un intercepto positivo indica un mayor grado de aceptación del criterio, en los primeros puestos del ordenamiento, pero si es el intercepto es negativo indica un rechazo en los primeros puestos, el estadístico Chi cuadrado nos indica la certeza de la aceptación o rechazo de los criterios en las primeras posiciones. Diferentes grupos de productores evaluaron los materiales en campo usando algunos de los criterios definidos: susceptibilidad a plagas y enfermedades, tamaño de fruto, arquitectura de planta, características de fruta, producción, cuajamiento y floración. Usando estos criterios, cada material fue clasificado como Bueno, Regular o Malo. No todos los materiales fueron calificados para todos los criterios. Es necesario tener en cuenta que para los productores de esta zona el mercado es fruta para industria y así lo calificaron, sin embargo algunos comentaron sobre materiales aptos para mercado fresco (Tabla 6).

Tabla 6. Materiales y características calificados como bueno por productores.

Código Material	**Criterio**	**Calificación (Bueno)**	**Razón**
EC-39	Tamaño de fruta	grande – >4,0 cm y/o 90 gr.	Pocos frutos conforman un kg, asegurando un buen % de cuajamiento se obtiene una alta producción.
ER-19			
WM-E1			
SEC-31	Características de fruta:	Fruto muy aromático y de buen sabor. Cáscara delgada y con poca semilla	Tendría buena aceptación por la industria
WM-E1	Arquitectura de planta.	Formación adecuada, tallo grueso	Facilita las labores y resiste a rajamiento

Por el contrario materiales que definitivamente no cumplen los criterios de los productores se presentan en la tabla 7

Tabla 7. Materiales y características calificados como malo por productores.

Código Material	Característica calificada como Malo	Calificación (malo)	Razón
SER-15	Tamaño de fruta	Pequeño < 3.0 cm,	No es aceptado por la industria.
SER-7			
ER-10	Arquitectura de planta	Pocas ramas productivas, con tuna, mala formación	Dificulta las labores culturales.
SS-E2	Resistencia a plagas y enfermedades	Susceptible a ácaros y antracnosis	Incrementa costos de producción
VM-E2			

En general los materiales evaluados fueron calificados como buenos por el tamaño de fruto y como malos por si no poseen resistencia a enfermedades y plagas. Para los restantes criterios los grupos presentaron diferencia de opinión.

Se correlacionaron estos dos criterios tamaño de fruto y resistencia a plagas y enfermedades, por los mismos grupos de bueno, regular y malos, y se encontró que los materiales ER19 y SEC31 se encuentran en el cuadrante Bueno x Bueno y que los materiales PL8, PL19, PL35 en el cuadrante Bueno X Regular, siendo estos cinco materiales los más interesantes para los productores. Los materiales SER7 y SER15 fueron calificados como malos para las mismas características, (Figura 18).

Lamentablemente esta evaluación se realizó para el lote 1 de Santa Rosa de Cabal, 24 materiales y no sobre todos, pero se cuenta con la metodología para ser aplicada a otros materiales y en otras localidades.

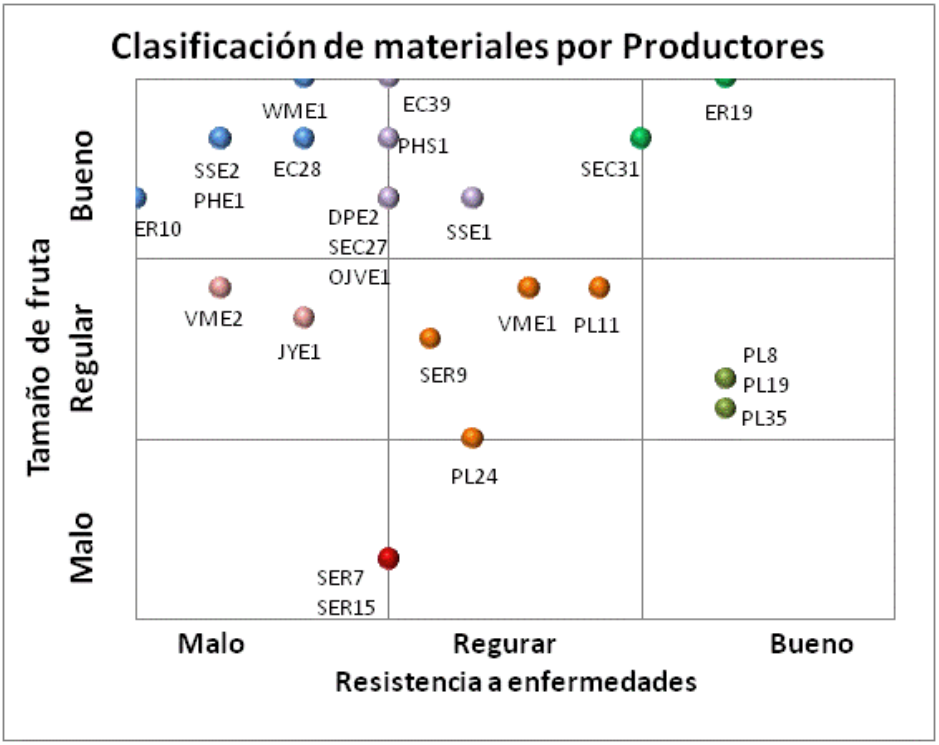


Figura 18. Correlación entre tamaño de fruto y resistencia a enfermedades en la evaluación participativa.

Aceptación de materiales por parte de la industria

Luego de los análisis se obtuvo una descripción para cada material por parte de Sandra García, analista de calidad de fruta, de la empresa Productora de Jugos; estas observaciones son tenidas en cuenta para la compra de fruta por parte de la empresa (Tabla 8). El material PH-S1, fue el único que pasó los estándares de la empresa. Posteriormente para otros materiales como el PL8 y SEC-31 se realizaron análisis por parte de la industria Casa Luker, expresando que podrían tener un gran impacto como mezcla ya que el primero aporta grados Brix y el segundo Color de pulpa verde esmeralda (comunicación personal Mauricio Salazar).

Tabla 8. Resultados de análisis de materiales en Productora de Jugos S.A.

DP - E1	Problema de antracnosis, bajo contenido de semilla, sabor no característico de la fruta. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
JY - E1	Presenta características no propias del lulo industrial que procesa PROJUGOS Cumple parámetro de brix pero no la acidez , no la parte sensorial de la variedad utilizada por PROJUGOS.
PH - S1	Semilla grande Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, sensorialmente similar al lulo Selva
PL 11	Fruta y semilla pequeñas Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
PL 19	Alta presencia de pelusa, sabor ácido muy astringente. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
PL 24	Consistencia ideal para pelado Cumple parámetro de brix pero no la acidez , no la parte sensorial de la variedad utilizada por PROJUGOS.
PL 35	Menor presencia de pelusa, cáscara de color amarillo naranja uniforme, cáscara muy aferrada a la pulpa. Mucho desprendimiento de semilla. Una unidad con antracnosis, otra sobremadura. Alto contenido de semilla. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
PL 8	Cáscara muy aferrada a la pulpa, color amarillo naranja, semilla grande, no característico pero agradable. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
SEC 27	Unidad con pasador, indicios de fermentación, sabor químico residual, no se realiza rendimiento. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial.
SER 9	Cáscara más suelta a la pulpa color amarillo naranja Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
SS - E1	Problema de antracnosis, bajo contenido de semilla Cumple parámetro de brix pero no la acidez , no la parte sensorial de la variedad utilizada por PROJUGOS.
VM - E1	Semilla grande Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial
WM - E1	Presencia de antracnosis, sabor astringente. Cumple parámetro fisicoquímico como la variedad utilizada por PROJUGOS, pero no sensorial

2.2.13.5. Conclusiones

- Se identificaron materiales que cuentan con características de interés superiores a las referencias comerciales, para mejoramiento y producción para mercados de fruta fresca y procesados.

- Se observaron diferencias entre materiales frente a características específicas, de resistencia a enfermedades, producción o calidad de fruta.

- Tres clones (PL9, PL24 y PL11) mostraron resistencia alta tanto a *Colletotrichum* spp., como a *Phytophthora infestans*.

- Con la información colectada se determinó, que el ciclo productivo del lulo en las dos condiciones está entre los 16 a 20 meses. Existen materiales como los PL que en condiciones de Santa Rosa siguen en un buen nivel de producción luego de los 20 meses de siembra.

- Es posible encontrar fuentes para mejoramiento a partir de la diversidad de materiales existente en campo.

- La metodología desarrollada y las características que mostraron diferencias son una herramienta clave para el futuro proceso de mejoramiento.

2.2.13.6. Recomendaciones

Con base en los trabajos realizados se logró ajustar metodologías para posteriores evaluaciones de materiales en campo, en aspectos como: desarrollo de planta, arquitectura, fenología y tiempo a etapas críticas, así como aspectos de rendimiento y calidad, definiendo variables críticas y de interés para los diferentes actores.

Parte de las metodologías son los formatos para toma de información cuantitativa y cualitativa proveniente de las evaluaciones participativas, procedimientos de análisis de información e identificación de materiales superiores y de interés.

Como se mencionó en varios apartes son muchos los criterios de selección y su importancia dependerá de la óptica de cada actor en la cadena, quien busca resolver sus necesidades sentidas inmediatas, sin tener muchas veces en cuenta las necesidades de los otros eslabones. Es menester de los nuevos investigadores y mejoradores conciliar todos los puntos de vista y ofrecer soluciones acordes a todos ellos y con una respuesta clara al mercado.

Con esta información y con los resultados de las evaluaciones y se conformaron tres grupos de materiales que presentan características de interés, en varios casos tenemos características que podrían mostrar avance de forma conjunta y otras que claramente son opuestas, como la resistencia a enfermedades y las características de calidad del fruto.

2.2.13.7. Bibliografía

Álvarez, E., Mejía de los ríos, JF; Huertas, CA; Varón De Agudelo, F. 2003. Detección y caracterización molecular de un fitoplasma, asociado con el "machorreo" del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia. Fitopatología Colombiana. 2003. 27(2):71-76.

Bermeo, A. 2005. Caracterización de la variabilidad morfológica y algunos atributos químicos de los frutos en una colección de lulo (*Solanum quitoense* Lam) y especies relacionadas de la Sección Lasiocarpa. Tesis de Grado Universidad Nacional de Colombia, Medellín. En edición.

Bohs, L. 2004. A chloroplast ADN phylogeny of *Solanum* Section Lasiocarpa. Systematic Botany. 29(1):177-187.

Gordillo, O.A. Y J.A. Rengifo. 2003 Caracterización fenotípica de cultivares de lulo. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 127 p.

Heiser, C.B.; Anderson, G. 1999. “New Solanums”. In: Perspectives on New Crops and New Uses. (Janick, J.; edit). ASHS Press. Alexandria, Virginia, USA. P. 379-384.

Hernández L.A. 2009, curso sobre evaluación participativa de tecnología (EPT) con productores, CIAT.

Whalen, M.D.; Costich, D.; Heiser, C.B. 1981. Taxonomy of section Lasiocarpa. Gentes Herbarium. 12:41-129.
Yuri J.A., Lepe, V. y Vásquez J.L., 2008, Intensificación de la carga vs calidad de fruta, Pomaceas, vol 8 no.4.

2.2.14. Metodología *in vitro* para la evaluación de germoplasma de lulo *Solanum* spp. bajo la presión de toxinas de *Colletotrichum acutatum*[32]

Objetivo Del Proyecto (2): *Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia.*

2.2.14.1. Objetivo

Desarrollar una metodología que permita la evaluación de germoplasma de lulo para buscar tolerancia a *Colletotrichum spp*

2.2.14.2. Marco Referencial

El Lulo *Solanum quitoense* Lam. es una especie vegetal que en los últimos años ha cobrado importancia y es utilizado tanto para consumo directo como materia prima a nivel agroindustrial para la elaboración de mermeladas, dulces y bebidas. Actualmente este cultivo ha aumentado su área de producción en Colombia (FNFH et al. 2006), en esta medida también se ha elevado el uso de insumos agroquímicos que no solo incrementan los costos de producción sino que residuos de este tipo tienen un efecto deletéreo sobre la salud humana y el ambiente; este consumo de agroquímicos se hace para contrarrestar los efectos que causan ciertas enfermedades y plagas al cultivo. En esta medida los mejoradores han buscado en especies cercanas la posibilidad de encontrar genes de resistencia a estos problemas fitosanitarios y también con ayuda de la biotecnología se proponen nuevas herramientas que pueden representar un gran avance en la selección de materiales tolerantes que permitan al productor hacer un uso más eficiente de los recursos y garantizar la sostenibilidad en el tiempo de la producción de lulo.
La enfermedad producida por este hongo *Colletotrichum acutatum*, conocida como antracnosis la cual su manejo representa entre el 5% y 16% de los costos de producción, está presente en las zonas productoras de Lulo de los departamentos de Caldas, Cauca, Antioquia, Boyacá entre otros, aunque con menos severidad que la Gota. La antracnosis representa un riesgo creciente y puede llegar a ocasionar grandes pérdidas, tanto a nivel de cultivo como de poscosecha (Tamayo, 2002). Por lo tanto, es necesaria la identificación de fuentes de resistencia en germoplasma que ofrezcan una alternativa de bajo costo para minimizar las pérdidas causadas por esta enfermedad

[32] Pedro Pablo Parra Giraldo, Alonso González y Rodrigo Hoyos Sánchez.

2.2.14.3. Metodología

Efecto del filtrado crudo de *Colletotrichum acutatum* sobre hojas de vitro plantas

Para determinar los síntomas causados sobre el tejido foliar y la termo estabilidad del filtrado crudo obtenido de la incubación en medio líquido Murashige and Skoog durante una semana del aislamiento LM-41C, éste se autoclavó por 20 minutos, 120 ºC y 20 psi de presión. A cada hoja de vitro plantas del clon EC-28 se le causó una herida de 1 mm de diámetro y se adicionaron 10 micro litros de filtrado crudo. Los tratamientos consistieron en la adición de filtrado crudo autoclavado y no autoclavado y los controles en la adición de agua destilada estéril y medio de cultivo sin inocular, posteriormente el tejido foliar se dispuso en cámara húmeda en cajas petri y fueron selladas con película plástica vinilpel y dispuestas en el cuarto de crecimiento, el comportamiento de tejido foliar fue reportado 0, 24, 48 horas y 10 días después de la adición del filtrado crudo.

Efecto del filtrado crudo sobre vitro plantas desarrolladas de tres materiales de lulo con diferentes grados de tolerancia a la antracnosis.

Se sembraron ápices de 1,5 cm de longitud de los materiales EC-39, EC-28 y PL-19, individualmente en frascos de 135 c.c., con 20 ml de medio de cultivo de lulo. Los frascos se mantuvieron en cuarto de crecimiento a 28±2°C, con un fotoperiodo 12/12-h (día/noche), durante cuatro semanas, pasado este tiempo se adicionó directamente sobre la superficie del medio de cultivo 1 ml de filtrado crudo autoclavado y no autoclavado obtenido a partir del aislamiento LM-41C incubado una semana. Los controles consistieron en plantas que continuaron su desarrollo normal durante el ensayo en medio de cultivo A Lulo. Cuatro semanas después de la adición de filtrados crudos se realizó la evaluación. Fueron evaluadas tres plantas por tratamiento.

Materiales de lulo PL-24, PL-19, PL-11, EC-28 y EC-39 sembrados en medio de cultivo con adición de 3% de filtrado crudo de un aislamiento de alta patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*

Se obtuvo por medio de la incubación en medio líquido Murashige and Skoog durante una semana de un aislamiento de alta patogenicidad para *S. quitoense* filtrado crudo estéril donde están contenidas las toxinas del hongo. Se prepararon medios de cultivo para lulo con la adición del 3% de filtrado crudo. Se sembraron en este medio, ápices de 1,5 cm de longitud de cinco materiales los cuales fueron evaluados cuatro semanas después de siembra a los cuales se les evaluó, numero de hojas, área foliar y desarrollo de raíces. El análisis estadístico correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial.

2.2.14.4. Resultados y Discusión

Efecto del filtrado crudo de *Colletotrichum acutatum* sobre hojas de vitro plantas

Las hojas de vitro plantas del clon EC-28 presentaron síntomas de necrosis 24 horas después de la adición del filtrado crudo autoclavado y no autoclavado, las hojas de ambos tratamientos presentaron manchas, puntos necróticos y halo clorótico en la zona adyacente a la herida y en el área por donde se esparció el filtrado crudo. Los tratamientos control que correspondieron a la adición de agua doblemente deionizada estéril y medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) sin inocular no presentaron síntomas similares a los anteriormente mencionados, se presentó una oxidación en las células adyacentes a la herida por motivo de la exposición de las células al ambiente. Se observó que las hojas de vitro plantas del clon EC-28 presentaron síntomas similares cuando se les adicionó filtrado crudo de una semana de incubación del aislamiento LM-41C autoclavado y no autoclavado. Imagen 1. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jayashinge (2000) reporta que después de someter a una temperatura de 100 ºC la actividad el filtrado crudo no fue afectada, cuando se adicionó a hojas de *Hevea brasilensis* y *Polyalthia* sp. Pero la esterilización a 15 libras de presión por 15 minutos redujo levemente la toxicidad de las toxinas aunque no las destruyó; por tanto las toxinas de *C. acutatum* pueden ser consideradas termoestables. Sin embargo Sharma et al. 1969 citados por Jayashinge, 2000 reportaron que los filtrados crudos de *C. gloesporioides* agente causal de la muerte descendente en cítricos es termolábil sugiriendo que los agentes fitotóxicos que esta especie produce son diferentes a los reportados para la especie *C. acutatum.*

Imagen 1. Ensayo de termo estabilidad del filtrado crudo desde el momento de adición de toxinas de *Colletrotrichum acutatum* contenidas en filtrado crudo de una semana de incubación del aislamiento LM-41C de alta patogenicidad A. Control agua B. Control Mursashige and Skoog sin inocular C. Adición de filtrado crudo autoclavado D. Adición de filtrado crudo no autoclavado.

Efecto del filtrado crudo sobre vitro plantas desarrolladas de tres materiales de lulo con diferentes grados de tolerancia a la antracnosis.

Cuatro semanas después de la adición del filtrado crudo en los materiales castilla EC-28 y EC-39 se presentó una inhibición en el crecimiento, clorosis y necrosis en las hojas más jóvenes y en el meristemo apical, necrosis, disminución del

crecimiento y cantidad de las raíces, el material PL-19 considerado tolerante no presentó este tipo de síntomas a nivel foliar aunque se presentó necrosis en las raíces en menor proporción, la cantidad y longitud de estas disminuyó respecto al control. Imagen 2. Las vitro plantas a las cuales no se les adicionó filtrado crudo, no presentaron ninguno de los síntomas anteriormente descritos. El comportamiento de los materiales según esta metodología de adición de los filtrados crudos indicó que el híbrido interespecifico PL-19 considerado como tolerante presentó un mejor desarrollo que los materiales castilla EC-39 y EC-28 considerados susceptibles.

Imagen 2: Adición de filtrado crudo no autoclavado(izquierda) y no autoclavado (derecha) de una semana de incubación del aislamiento de alta patogenicidad LM-41C a vitro plantas de cuatro semanas de desarrollo de los materiales **A.** PL-19, **B.** EC-28 y **C.** EC-39.

En las vitro plantas sometidas a filtrado crudo autoclavado se presentó este mismo comportamiento, donde los materiales castillas presentaron una mayor afectación por parte de las toxinas contenidas en el filtrado crudo en comparación con el híbrido interespecífico PL-19 donde no fueron visibles a nivel foliar estos síntomas. Imagen 2, Estos resultados soportan ensayos anteriores presentados en este trabajo donde se sugiere la termo estabilidad de las toxinas de *Colletotrichum acutatum* del aislamiento LM-41C y concuerdan con los resultados obtenidos por Jayashinge, 2000. Estas condiciones de esterilización fueron similares a las que fue sometido el filtrado crudo para el presente ensayo 105ºC, 20 minutos y 20 lbs. de presión, bajo estas condiciones los filtrados crudos no disminuyeron su actividad toxica sobre los materiales de lulo.

Materiales de lulo PL-24, PL-19, PL-11, EC-28 y EC-39 sembrados en medio de cultivo con adición de 3% de filtrado crudo de una cepa de alta patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*

Se encontraron diferencias significativas entre los materiales de lulo evaluados para las variables Numero de hojas, área foliar y peso seco de raíces, los ápices sembrados en medio de cultivo sin la adición de filtrado crudo, tratamientos control fueron estadísticamente diferentes a los ápices sembrados en medio de cultivo con la adición del 3% de filtrado crudo del aislamiento LM-41C de alta patogenicidad.
Los resultados muestran que los materiales híbridos PL-24, PL-19. PL-11 considerados como tolerantes presentan porcentajes de inhibición menores que los observados en los materiales castilla EC-28 y EC-39 en cuanto al desarrollo de

área foliar, mientras que en el desarrollo de raíces no se evidencia este mismo comportamiento, siendo el área foliar quien mejor explica la capacidad de los ápices de desarrollarse en presencia de toxinas según su grado de tolerancia.

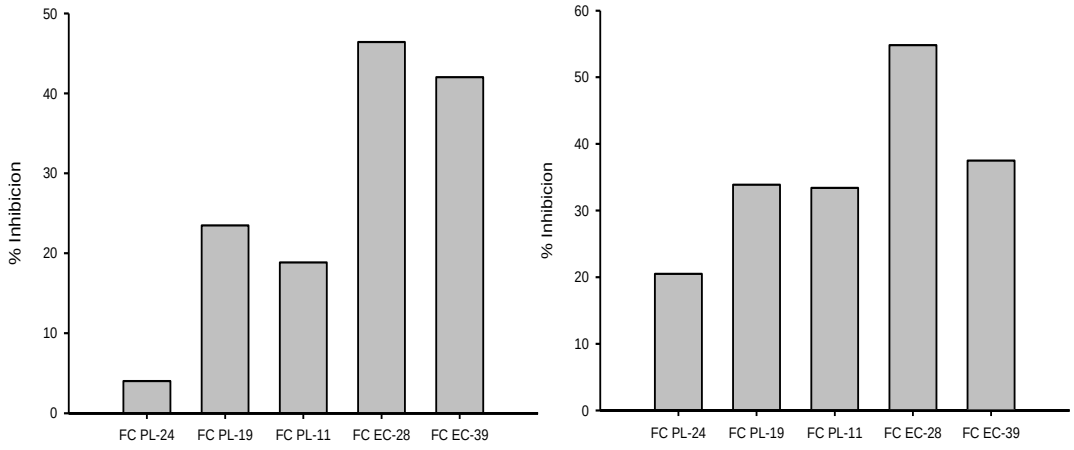


Figura 1: Porcentaje de inhibición del desarrollo de vitro plantas de los clones PL-24, PL-19, Pl-11, EC-28 y EC-39 sembrados en medio de cultivo A con dilución 3% e incubado durante una semana en medio líquido del aislamiento LM-41C de *Colletotrichum acutatum* **A.** Porcentaje de inhibición del desarrollo de tejido foliar **B.** Porcentaje de inhibición del desarrollo de raíces.

Los porcentajes de inhibición observados para el material PL-24 fueron 4% y 20,4 %, el PL-19 presentó una inhibición de 23,4% y 33,8%, PL-11 de 18,8% y 33,4%, mientras que los materiales castilla EC-28 y EC-39 presentaron una inhibición de 46,4% y 54,8% y 42% y 37,4% en las variables área foliar y peso seco de raíces respectivamente. Como se puede observar en la figura 1.

2.2.14.5. Conclusiones

- El protocolo establecido permite obtener filtrados crudos estériles que inducen síntomas sobre hojas y ápices desarrollados *in vitro* para la evaluación de germoplasma de lulo con posible tolerancia a Antracnosis.
- La adición de filtrados crudos sobre tejido foliar y medio de cultivo a plantas desarrolladas inducen síntomas visibles pero difícilmente cuantificables El sub cultivo de ápices en medio A, con diluciones de filtrado crudo, permitió cuantificar la disminución en el desarrollo de los explantes.
- Los materiales híbridos interespecificos presentan menor porcentaje de inhibición cuando son sembrados en medio de cultivo con una dilución de 3% de filtrado crudo de un aislamiento de alta patogenicidad para *S. quitoense*
- Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los resultados obtenidos en las evaluaciones realizadas en campo y sobre fruto en condiciones de laboratorio.

2.2.14.6. Recomendaciones

- Es necesario realizar una caracterización de las toxinas presentes en el filtrado crudo
- La cuantificación es un paso de gran importancia para establecer dosis que permitan diferenciar entre materiales, basándose en la concentración real de la toxina.

2.2.14.7. Bibliografía

SVABOVA, L. 2005. In vitro selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. En: J. Phytopathology. 153, 52-64

SCHELMZ, E.A. Engelberth, J., Alborn H.T. 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins and volatile organic compounds in plants. PNAS 100: 10552-10557.

SLAVOV, S. 2005. Phytotoxins and in vitro screening for improved disease resistant plant. Agrobioinstitute, Sofía, Bulgaria. En: Biotechnol. And Biotechnol. Eq. 19/2005. pp. 48-55.

PATIÑO, C. 2009. Produccion in vitro de pectinasas por *Colletotrichum acutatum*. Acata Agronómica. Revista de la facultad de ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Vol. 59. Nro.1 80-90.

MARTÍNEZ, D., A. GIRALDO. & R. A. HOYOS. 1999. Efecto de las toxinas de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre tejido foliar y la formación de callos a partir de suspensiones celulares de tomate de árbol *Cyphomandra betaceae.* En: Ascolfi informa. Vol: 25 Issue:5,47-48.

2.2.15. Caracterización morfoagronómica de 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense* * *Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda[33].

Objetivo del proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia".*

2.2.15.1. Objetivos

- Contribuir a la caracterización morfoagronómica de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense* * *Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda.
- Describir las características morfoagronómicas de 24 materiales de lulo.
- Evaluar la contribución de las características morfoagronómicas en la variabilidad fenotípica de los materiales.

[33] Carlos Felipe Botero, estudiante de pregrado de agronomía de unisarc, Jesús Zuleta Ospina ingeniero agrónomo y dicente de unisarc.

2.2.15.2. Metodología

El estudio se realizó en la granja La María de UNISARC, en la vereda El Manzanillo, municipio de Santa Rosa de Cabal Risaralda, latitud N 4° 55' y longitud oeste 75° 38', a 1600 msnm, temperatura media 19,46°C, precipitación 2308 mm/año, humedad relativa 80.73%, brillo solar 3,85 horas luz día, suelos ondulados a quebrados, serie Chinchiná. (Ramírez, 2004).

PRIMERA FASE

Materiales de lulo

24 materiales de lulo, diez tipo castilla, nueve de origen desconocido y cinco híbridos interespecíficos. En la tabla 1 se observa, código del material, procedencia y tipo de material.

Tabla 1. Relación de los 24 materiales de lulo evaluados en el Eje Cafetero.

Clon	Procedencia	Tipo de material
Vm - E1	Pescador Cauca	Castilla
EC – 39	CEFA	Desconocido
Wm - E1	Pescador Cauca	Castilla
SER – 9	CEFA	Desconocido
SS - E1	Tierradentro Cauca	Castilla
SER – 15	CEFA	Desconocido
EC -28	CEFA	Desconocido
ER – 10	CEFA	Desconocido
PL – 8	Rionegro Antioquía	Híbrido interespecífico
ER – 19	CEFA	Desconocido
SEC – 27	CEFA	Desconocido
PL – 24	Rionegro Antioquía	Híbrido interespecífico
DP - E2	Pescador Cauca	Castilla
JY -E1	Tierradentro Cauca	Castilla
PH –SI	Pescador Cauca	Castilla
SEC – 31	CEFA	Desconocido
SS -E2	Tierradentro Cauca	Castilla
PL – 35	Rionegro Antioquía	Híbrido interespecífico
Vm - E2	Pescador Cauca	Castilla
OJV - E1	Tierradentro Cauca	Castilla
PL – 19	Rionegro Antioquía	Híbrido interespecífico
PH -E1	Pescador Cauca	Castilla

PL – 11	Rionegro Antioquía	Híbrido interespecífico
SER – 7	CEFA	Desconocido

Fuente: CIAT, 2010

Diseño Experimental.

El diseño experimental fue en Bloques Completos al Azar con 24 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada tratamiento correspondió a un material de lulo. La unidad experimental estuvo conformada por cinco plantas. En el sistema de bloqueo se tuvo en cuenta el gradiente de pendiente del terreno.

La distancia de siembra fue de 3*3 m al triángulo. El área de la unidad experimental fue de 39 m^2.

Para efecto de registro de la información se tomaron datos de las tres plantas centrales de cada unidad experimental.

Variables

- ✓ **Altura de la planta.** La altura se midió quincenalmente tomando como referencia la base del tallo y la altura máxima de la copa de la planta.

- ✓ **Descriptores morfológicos**

  - Emisión de número de hojas.
  - Porcentaje volcamiento: se contaron con las plantas que sufran volcamiento % V= No total de plantas/No de plantas volcadas*100.
  - Altura de mesa productiva:

Análisis estadístico.

- **Altura de la planta.** Para el análisis de esta variable se utilizó el paquete estadístico SAS 9.1 para realizar el análisis de varianza y la prueba de comparación entre medias mediante el estadístico de Duncan.

- **Tasa de crecimiento.** Se utilizó el modelo de regresión lineal del paquete SAS 9.1, relacionando los valores solo hasta el momento donde hubo crecimiento positivo.

- **Descriptores morfoagronómicos.** Estas características fueron analizadas mediante el paquete estadístico SAS 9.1 para obtener el análisis de varianza, la prueba de comparación de medias y agrupación de materiales por características mediante la aplicación proc clúster

2.2.15.3. Resultados y Discusión

Los materiales con mejor tasa de crecimiento bajo las condiciones del Eje Cafetero fueron EC28, EC39, SEC31, WME1, PL24 y OJVE1 y los materiales con mejor altura en la mesa productiva fueron WME1, JYE1, SER7 y ER10.

2.2.16. Caracterización morfoagronómica de 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense * Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda[34].

Objetivo del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.16.1. Objetivos

- Contribuir a la caracterización morfoagronómica de lulo *Solanum quitoense* Lam y *Solanum quitoense * Solanum hirtum*, en el departamento de Risaralda.
- Describir las características morfoagronómicas de 15 materiales de lulo.
- Evaluar la contribución de las características morfoagronómicas en la variabilidad fenotípica de los materiales.
- Determinar el tiempo de desarrollo del fruto en 15 materiales de lulo.

2.2.16.2. Marco Referencial

En Santa Rosa de Cabal Risaralda, se evaluaron 15 materiales de lulo, en Bloques Completos al Azar, cuatro repeticiones y registros a través del tiempo. Se midió altura, tasa de crecimiento y 48 descriptores morfológicos, se determinó la fenología del fruto. Se analizó como parcelas divididas, los materiales fueron la parcela principal y los tiempos de evaluación las subparcelas. Altura, altura de mesa productiva, número de racimos, número de espinas en tallo, haz y envés de hojas; número de tricomas en tallo, haz y envés, sépalo, pétalos, longitud de espinas en haz y envés, peciolo, limbo y frutos, presentaron diferencias significativas entre materiales. Se identificaron materiales con características deseadas por los agricultores. Se determinó que la variabilidad fenotípica de los materiales está asociada a caracteres de rusticidad lo que corrobora que es un cultivo en vía de domesticación. Para la duración de los estados de fenología del fruto no se encontraron diferencias significativas.

Palabras clave: mesa productiva, tricomas, espinas, *Solanum quitoense*, haz, envés, limbo.

---

[34] Jesús Zuleta Ospina, Profesor Facultad de Ciencias Agrícolas UNISARC, Adrian Mauricio Valencia Franco, estudiante de pregrado de Agronomía de UNISARC, Alonso González Mejía Líder Frutas Tropicales CIAT , Jaime Eduardo Muñoz Florez, Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

2.2.16.3. Metodología

El estudio se realizó en la granja La María en la vereda El manzanillo, municipio de Santa Rosa de Cabal Risaralda, latitud N 4° 55' y longitud oeste 75° 38', a 1600 msnm, temperatura media 19,46°C, precipitación 2308 mm/año, humedad relativa 80.73%, brillo solar 3,85 horas luz día, suelos ondulados a quebrados, serie Chinchiná. (Ramírez, 2004).

MATERIALES DE LULO

15 materiales de lulo provenientes de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda y de la colección del Banco Nacional de Semillas. Diez materiales fueron propagados in vitro y cinco semilla sexual. . En la tabla 1 se observa procedencia, código del material, forma de propagación. Todos los materiales son tipo castilla.

Tabla 7. Relación de los 15 materiales de lulo evaluados en el Eje Cafetero.

Procedencia	Productor	Código del material	Forma de propagación
Darien – Valle del Cauca	Fersain García	FGE1	In vitro
	Luis Henriquez	LHE1	In vitro
	Jorge Solarte	JSE3	In vitro
		JSE2	In vitro
		JSE1	In vitro
Tuluá – Valle del Cauca	Yolanda Díaz Baena	YDE3	In vitro
		YDS1	In vitro
Ginebra – Valle del Cauca	Marcelino Bolaños	MBG1	Sexual
Santa Rosa de Cabal – Risaralda	Abelardo Gutiérrez	AGE1	In vitro
	Olga Rendón	ORE1	In vitro
		ORE2	In vitro
Banco Nacional de Semillas en Corpoica	Cauca	120052	Sexual
	Huila	120055	Sexual
	Nariño	120044	Sexual
	Valle del Cauca	120043	Sexual

Fuente: CIAT, 2010

2.2.16.4. Metodología

Diseño Experimental.

El diseño experimental fue en Bloques Completos al Azar con 15 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada tratamiento correspondió a un material de lulo. La unidad experimental estuvo conformada por cinco plantas. En el sistema de bloqueo se tuvo en cuenta el gradiente de pendiente del terreno.

La distancia de siembra fue de 3*3 m al triángulo. El área de la unidad experimental fue de 39 m^2.

Para efecto de registro de la información se tomaron datos de las tres plantas centrales de cada unidad experimental.

Variables

- ✓ **Altura de la planta.** La altura se midió quincenalmente tomando como referencia la base del tallo y la altura máxima de la copa de la planta.

- ✓ **Tasa de crecimiento:** se tomaron para cada material modelos de regresión para discutir el comportamiento de la variable a través del tiempo, se utilizó el programa Curve Expert y se estimaron los parámetros y el coeficiente de determinación R^2

- ✓ **Descriptores morfológicos**

  - Diámetro del tallo: se midió con un calibrador a 5 cm de la base del tallo, en cm
  - Porcentaje volcamiento: se contaron con las plantas que presentaron volcamiento y se aplicó la fórmula % V= (No total de plantas/No de plantas volcadas)*100.
  - Numero de ramas estructurales: número de ramas dominantes.
  - Vigor de la planta: para su evaluación se propuso una escala de estimación del vigor de excelente, sobresaliente, aceptable, deficiente e insuficiente
  - Posición de ramas estructurales y estrato: se determinó por la posición de las ramas en ortotrópicas, plagiotrópicas y semi orto o semi palgio.
  - Altura de la mesa productiva: se midió desde la base del tallo hasta el punto donde se bifurcan las ramas estructurales, en cm
  - Longitud espinas: se midió por medio de un calibrador en cmm
  - Numero de nervaduras laterales: se contó el número de nervaduras en la hoja cuatro.
  - Estrías en el tallo: se determinó observando si el tallo presenta estrías 0. Ausencia; 1 débil; 2. Medio; 3 abundante.
  - Numero de racimos por rama: se registró una de las ramas estructurales de la planta
  - Espinas en tallo y hoja por cm^2: se contó la cantidad de espinas en tallo y hoja en un recuadro de 2*2 cm^2.
  - Forma espinas tallo y hoja: se determinó de acuerdo a su forma
  - Longitud de espinas tallo. Se midió por medio del calibrador en mm
  - Numero de tricomas cm^2 en tallo, hoja y flor
  - Numero de espinas hoja en haz y envés: se contó la cantidad de espinas en ambos lados de la hoja
  - Longitud espinas hojas haz y envés: por medio de un calibrador se midió la longitud de las espinas en haz y envés de la hoja en mm
  - Longitud del limbo, del peciolo y ancho de hoja: se determinó por medio de un flexómetro, registrada en la hoja cuatro en cm

- Longitud del sépalo y pétalo: la medición se realizó por medio del calibrador en mm
- Numero de flores por racimo: se contó la cantidad de flores tiene un racimo que se seleccionó en campo
- Diámetro de la cicatriz pedicular: se midió por medio del calibrador en mm

✓ **Fenología del fruto**

La fenología del fruto se determinó seleccionando un racimo floral por planta, se llevó un registro de campo y se apoyó en registro fotográfico, cada racimo fue marcado con una cinta, se registró tres veces por semana y se determinó el tiempo de duración de cada una de las etapas de la flor empezando por botón floral, apertura de flor, cuajamiento, formación del fruto, madurez fisiológica y madurez de cosecha.

✓ **Agrupación de materiales por características morfoagronómicas.** Se utilizó el proc clúster de SAS versión 9.1 con las variables anteriormente descritas

Análisis Estadístico.

✓ **Altura de la planta.** Para el análisis de esta variable se utilizó el paquete estadístico SAS 9.1 para realizar el análisis de varianza y la prueba de comparación entre medias mediante el estadístico de Duncan.

✓ **Tasa de crecimiento.** Se utilizó el modelo de regresión lineal del paquete SAS 9.1, relacionando los valores solo hasta el momento donde hubo crecimiento positivo.

✓ **Descriptores morfoagronómicos.** El análisis de varianza se hizo mediante el paquete estadístico SAS 9.1, la comparación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Duncan y la agrupación de los materiales por características morfoagronómicas mediante le pro clúster.

✓ **Fenología del fruto.** El análisis de varianza se hizo mediante el paquete estadístico SAS 9.1, la comparación de medias mediante la prueba de rango múltiple de Duncan.

La variabilidad fenotípica de los materiales está dada por caracteres asociados a rusticidad. Los materiales que presentan mayor número de características deseadas por los productores son: JSE2, YDSI, AGE1, ORE2, 120052, 120055 y 120044.

2.2.17. Respuesta diferencial a la incidencia de los principales problemas fitosanitarios en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam, *S. quitoense * s. hirtum* bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda[35].

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.17.1. Objetivos

- Evaluar la respuesta diferencial a la incidencia de los principales problemas fitosanitarios en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* lam, *S. quitoense * S. hirtum* bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda.

- Identificar materiales de lulo que presentan bajos índices de plagas y enfermedades como resultado de la baja presencia de estos.

- Relacionar el comportamiento de las plagas y enfermedades de mayor incidencia en lulo con las condiciones climáticas registradas durante el desarrollo del ensayo.

- Determinar la variabilidad fenotípica de los materiales de lulo respecto al comportamiento de las plagas y enfermedades.

2.2.17.2. Marco Referencial

El lulo *Solanum quitoense* se siembra en Colombia en 14 departamentos, 149 municipios y 1719 veredas (DANE, 2004) y genera ingresos a cerca de 6500 familias de economía campesina (Muñoz, 2010). Los principales problemas fitosanitarios que afectan el lulo en la zona de estudio son gota *Phytophthora infestans*, antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* y pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* (Bernal, 2000 y Zuleta, 2006). En el eje cafetero en Santa Rosa de Cabal, se evaluaron 24 materiales de lulo en un diseño experimental de Bloques Completos al Azar con 24 tratamientos y cuatro repeticiones, cada tratamiento correspondió a un material de lulo, la unidad experimental estuvo conformada por cinco plantas y la distancia de siembra fue de 3 m al triángulo.
Para determinar la incidencia de plagas y enfermedades se realizaron 29 evaluaciones entre los 51 y 282 días después de siembra. Los materiales con menor incidencia a *Cladosporium* sp fueron: PL8, PL 35, PL 24 y PL 19, a *Fusarium* sp WME1, PL8, PL 24 y PL 11, a ácaros PL8, PL 35, PL 19 y SSE1, a

[35] Diana Milena González Valencia estudiante de pregrado de Agronomía de UNISARC, Jesús Zuleta Ospina Ingeniero Agrónomo y docente de UNISARC, Alonso González Mejía, Líder Frutas Tropicales CIAT, Jaime Eduardo Muñoz Florez, Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

trips PL 24, PL 35, SER 7, SER 9 y PHSI, a complejo crisomélido SER 15, PL 35, SEC 31, SER 7 y PL 24, y a pasador de fruto PL 8, PL 19, PL 11, PL 24, SER 7, SER 9 y SER 15. Los materiales de menor índice de plaga fueron: PL 8, PL 11, PL 19, PL 24, PL 35, SER 9 y SER 15, loa los de menor índice de enfermedad PL 8, PL 11, PL 24, PL 35, WM E1, VM E1 y ER 10.

La agrupación por características fitosanitarias generó tres grupos así: grupo 1, identificado por índice de plaga alto, alta incidencia de ácaros, crisomélidos, gusano enrollador, chiza y pasador de fruto y baja incidencia a gusano bombillo. En el grupo 2 están los materiales con alta incidencia a ácaros y *Cladosporium* sp y el grupo 3 los materiales presentan baja incidencia a *Meloidogyne* spp y *Cladosporium* sp.

2.2.17.3. Metodología

La localización, materiales de lulo y diseño experimental es igual para los tres temas de estudio en cada una de las fases de evaluación.

Variables.

- **Incidencia de plagas y enfermedades.** Se realizaron 29 registros consecutivos entre el 26 de octubre de 2007 y mayo 30 de 2008. Previo a las evaluaciones se hizo trabajo de entrenamiento sobre el reconocimiento de los problemas fitosanitarios y su respectivo monitoreo. Los registros se hicieron en las tres plantas centrales de cada unidad experimental, para facilitar el registro de la información, la evaluación siempre se hizo sobre un cuadrante de la planta y se observó el área foliar y radicular.

Para el registro de la incidencia se utilizó la siguiente fórmula:

$$Incidencia(I) = \left(\frac{N^{o}\text{ de plantas enfermas}}{N^{o}\text{ Total de plantas}} \right) * 100\%$$

- **Tiempo de aparición de plagas y enfermedades con relación al desarrollo del cultivo (dds)**: se marcó la fecha inicial de aparición de los problemas fitosanitarios.

- **Índice de plaga e índice de enfermedad:** a cada variable fitosanitaria se le asignó un valor representativo de acuerdo a la importancia que ésta representa para el cultivo en la zona de estudio, dicho valor se afectó por el porcentaje de incidencia de cada variable y la sumatoria de los productos originó el índice de plaga y/o de enfermedad.

Tabla 5. Valores asignados para variables asociadas a plagas de acuerdo al impacto que ocasiona en la zona de estudio.

Plagas	Acaro	Trips	Gusano enrollador	Chiza	Complejo crisomélidos	Afidos	Gusano bombillo	Pasador de fruto	Grillo
FP	0,2	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,05

Tabla 6. Valores asignados para variables asociadas a enfermedades de acuerdo al impacto que ocasiona en la zona de estudio.

Enfermedad	Nematodos	Mancha clorótica	Gota	Antracnosis fruto	Fusarium	Bacteriosis	Alternaria	Antracnosis tallo	Mancha algodonosa
FP	0,3	0,2	0,1	0,3	0,4	0,2	0,05	0,2	0,1

- **Agrupamiento por comportamiento fitosanitario:** se utilizó el proc cluster de SAS versión 9.1 con las variables seleccionadas por coeficiente de variación y correlación de Pearson.

Análisis de varianza para la variable incidencia de plagas y enfermedades

Como se utilizó un diseño en Bloques Completos al Azar y se realizaron evaluaciones sobre la misma unidad experimental a través del tiempo, el modelo de análisis se asocia al diseño en parcelas divididas (Gómez et al, 1984). La parcela principal son los materiales de lulo y las subparcelas los tiempos de evaluación. Se tendrá un error de muestreo asociado a la variación entre plantas. Para comparar promedios se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

2.2.17.4. Resultados y Discusión

Hay materiales de interés por su comportamiento frente a las principales plagas y enfermedades que se presentan en el eje cafetero. Los materiales de menor índice de enfermedad son PL24, PL8, PL11, WME1, VME1, PL35 y ER10, mientras que los materiales de menor índice de plaga son PL8, PL35, PL19, PL24, PL11, SER 15 y SER 9, como se puede observar los materiales Pls son los mejores en cuanto al comportamiento sanitarios bajo condiciones del Eje Cafetero.

2.2.18. Respuesta a la incidencia, severidad e infestación de los principales problemas fitosanitarios en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam, bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda[36].

Objetivo Del Proyecto (2): "*Caracterizar las colecciones de germoplasma, por variabilidad genética y resistencia a plagas y enfermedades de mayor importancia"*

2.2.18.1. Objetivos

- Evaluar la respuesta diferencial a la incidencia, severidad e infestación de los principales problemas fitosanitarios en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam, tipo castilla, bajo condiciones agroclimáticas de Risaralda.

- Identificar materiales de lulo que presentan bajos índices de plagas y enfermedades.

- Relacionar el comportamiento de las plagas y enfermedades de mayor incidencia en lulo con las condiciones climáticas registradas durante el desarrollo del ensayo.

- Determinar la variabilidad fenotípica de los materiales de lulo respecto al comportamiento de las plagas y enfermedades.

2.2.18.2. Metodología

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Agrícolas en el programa de Agronomía en la Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal en la granja La María, localizada en la vereda El manzanillo, municipio de Santa Rosa de Cabal Risaralda, a 1600 msnm, temperatura media 19,46°C, precipitación 2308 mm/año, humedad relativa 80.73 % y brillo solar 3,85 horas luz día, suelos ondulados a quebrados, serie Chinchiná. (Ramírez, 2004). El trabajo inició en agosto de 2008 y se tomaron registros hasta febrero de 2010.

Se evaluaron 15 materiales de lulo provenientes de los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda y de la colección del Banco Nacional de Semillas. Diez materiales fueron propagados in vitro y cinco semilla sexual. En la tabla 1 se observa procedencia, código del material, forma de propagación. Todos los materiales son tipo castilla.

[36] Andrés Leonardo Franco Arias estudiante de pregrado de Agronomía de UNISARC.

Tabla 8. Relación de los 15 materiales de lulo evaluados en el Eje Cafetero.

Procedencia	Productor	Código del material	Forma de propagación
Darien – Valle del Cauca	Fersain García	FGE1	In vitro
	Luis Henríquez	LHE1	In vitro
	Jorge Solarte	JSE3	In vitro
		JSE2	In vitro
		JSE1	In vitro
Tuluá – Valle del Cauca	Yolanda Díaz Baena	YDE3	In vitro
		YDS1	In vitro
Ginebra – Valle del Cauca	Marcelino Bolaños	MBG1	Sexual
Santa Rosa de Cabal – Risaralda	Abelardo Gutiérrez	AGE1	In vitro
	Olga Rendón	ORE1	In vitro
		ORE2	In vitro
Banco Nacional de Semillas en Corpoica	Cauca	120052	Sexual
	Huila	120055	Sexual
	Nariño	120044	Sexual
	Valle del Cauca	120043	Sexual

Fuente: CIAT, 2010

El diseño experimental fue en Bloques Completos al Azar con 15 tratamientos y cuatro repeticiones. Cada tratamiento correspondió a un material de lulo. La unidad experimental estuvo conformada por cinco plantas, para el sistema de bloqueo se tuvo en cuenta el gradiente de pendiente del terreno. La distancia de siembra fue de 3*3 m al triángulo. El área de la unidad experimental fue de 39 m^2. Para efecto de registro de la información se tomaron datos de las tres plantas centrales de cada unidad experimental.

Se realizaron dos registros de incidencia de plagas y enfermedades uno en mayo y otro en junio de 2009, en las mismas fechas se registraron los niveles de infestación y severidad para plagas y enfermedades respectivamente. Previo a las evaluaciones se hizo trabajo de entrenamiento sobre el reconocimiento de los problemas fitosanitarios y su respectivo monitoreo. Los registros se hicieron en las tres plantas centrales de cada unidad experimental, para facilitar el registro de la información, la evaluación siempre se hizo sobre un cuadrante de la planta y se evaluó el área foliar y radicular.

Para el registro de la incidencia se utilizó la siguiente fórmula:

$$Incidencia(I) = \left(\frac{N^{o}\,\text{de plantas enfermas}}{N^{o}\,\text{Total de plantas}} \right) * 100\%$$

Para determinar la severidad de las principales enfermedades que se presentaron se hizo comparación del porcentaje de área de tejido afectado con los diagramas de severidad y los daños fueron descritos de acuerdo a las escalas de severidad previamente establecidas y/o propuestas por los autores. Los criterios que se

establecieron para la evaluación de las enfermedades mediante escalas o diagramas visuales de acuerdo con el grado de infección, tuvieron en cuenta el tipo de patógeno, los síntomas que causa, la presencia de signos o estructuras, el órgano de la planta que afecta y la variación en la expresión de la enfermedad a través del tiempo y las condiciones climáticas

Para el registro de los niveles de severidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$Severidad\ \ s\ =\ \frac{número\ de\ plantas*cada\ grado}{número\ de\ plantas\ evaluadas*grado\ mayor}\ *100$$

Los niveles de infestación se registraron

- **Índice de plaga e índice de enfermedad:** a cada variable fitosanitaria se le asignó un valor representativo de acuerdo a la importancia que ésta representa para el cultivo en la zona de estudio, dicho valor se afectó por el porcentaje de incidencia de cada variable y la sumatoria de los productos originó el índice de plaga y/o de enfermedad.

Tabla 9. Valores asignados para variables asociadas a plagas de acuerdo al impacto que ocasiona en la zona de estudio.

Plagas	Acaro	Trips	Gusano enrollador	Chiza	Complejo crisomélidos	Afidos	Gusano bombillo	Pasador de fruto	Grillo
FP	0,2	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,05

Tabla 10. Valores asignados para variables asociadas a enfermedades de acuerdo al impacto que ocasiona en la zona de estudio.

Enfermedad	Nematodos	Mancha clorótica	Gota	Antracnosis fruto	Fusarium	Bacteriosis	Alternaria	Antracnosis tallo	Mancha algodonosa
FP	0,3	0,2	0,1	0,3	0,4	0,2	0,05	0,2	0,1

- **Agrupamiento por comportamiento fitosanitario:** se utilizó el proc clúster de SAS versión 9.1 con las variables seleccionadas por coeficiente de variación y correlación de Pearson.

Análisis de varianza para la variable incidencia de plagas y enfermedades

Como se utilizó un diseño en Bloques Completos al Azar y se realizaron evaluaciones sobre la misma unidad experimental a través del tiempo, el modelo de análisis se asocia al diseño en parcelas divididas (Gómez et al, 1984). La parcela principal son los materiales de lulo y las subparcelas los tiempos de evaluación. Se tendrá un error de muestreo asociado a la variación entre plantas. Para comparar promedios se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

2.2.18.3. Resultados y Discusión

Los materiales tipo castilla de menor índice de plaga fueron 120043, JSE1, los materiales de menor incidencia a nematodos fueron ORE2, 120055 Y AGE1 y los materiales de menor incidencia a pasador de fruto *Neoluecinodes elegantalis* fueron 120055, LHE1, ORE1, YDE3 Y 120043.

2.2.18.4. Conclusiones y Recomendaciones

- Se destacan dentro de los resultados logrados del proyecto el haber desarrollado criterios pertinentes para la selección de materiales élite de mora y lulo mediante investigación participativa.

- La integración científica y tecnológica entre diferentes actores relacionados con la academia, la investigación, la producción, transformación y comercialización.

- La identificación de materiales superiores en aspectos de calidad, rendimiento, comportamiento fitosanitario y características deseadas morfoagronómicas, permite a los productores hacer una elección apropiada de materiales élite de lulo.

✓ Por la importancia de los resultados se recomienda efectuar jornadas de socialización que permitan una adecuada apropiación de los mismos.

2.2.19. Evaluación de rendimiento y calidad en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense y S. quitoense * S hirtum* en el departamento de Risaralda[37].

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

2.2.19.1. Objetivos

- Evaluar rendimiento y calidad en materiales de lulo en el departamento de Risaralda.

- Determinar las diferentes características organolépticas de los clones a evaluar.

- Cuantificar las variables de rendimiento.

---

[37] Diana Carolina Agudelo Marín estudiante de pregrado de Agronomía de UNISARC, Jesús Zuleta Ospina Ingeniero Agrónomo y dicente de UNISARC.

- Determinar las variables de calidad

2.2.19.2. Metodología

Los materiales y métodos son los mismos de los trabajos de la primera fase

Variables a evaluar

Variables de rendimiento

Las variables de rendimiento serán registradas semanalmente en formatos prediseñados que faciliten la captura de información y la alimentación de la base de datos, la parcela útil son 5 plantas y las experimentales son 3 para esta evaluación las 2 de los lados se deja como efecto de borde.

Estas variables se medirán desde inicio de floración hasta cosecha, y se tomara información de los siguientes aspectos:

- **Métodos para evaluar las variables de rendimiento**

Número de racimos por planta: esta variable se medirá semanalmente, para facilitar el registro, la planta será dividida en cuatro cuadrantes que definirán la posición a evaluar en la parcela útil de cada una de las unidades experimentales de tal manera que para la parcela 1 las posiciones a evaluar serán A, B y C y para la parcela 2 las posiciones a evaluar serán la D, A y B y así sucesivamente. Formato número 1.

- **Variables de calidad:**

Esta variable será medida a partir del inicio de cosecha, donde se evaluaran en campo o en laboratorio las siguientes características:
Métodos para evaluar las variables físico-químicas:
Métodos para evaluar las variables físico-químicas:

Apariencia y color de la fruta: esta variable medirá características físicas como: fruto fresco, fruto entero, fruto sano libre de ataque de insectos (pasador del fruto, ácaros) y enfermedades (antracnosis) que demeriten la calidad interna del fruto, forma característica del fruto, coloración homogénea de acuerdo a la tabla de color, consistencia firme, fisuras, deformaciones, sobre maduro, libre de daños mecánicos, humedecimientos externos anormales, olores extraños.

Diámetro del fruto: la muestra estará conformada por 6 frutos por parcela que serán recolectados en grado 3 y 4, a cada fruto de se le medirá el diámetro en la zona ecuatorial y se sacará el promedio, la medición se realizará con un calibrador.

Determinación del peso del fruto: de cada parcela se pesarán 6 frutos en grado 3 y 4, y se obtendrá el peso promedio de cada una de ellas. Esta medición se hará para cada una de las repeticiones en los cuatro bloques del ensayo.

PF = PP/TF
PF: peso del fruto
PP: peso promedio de cada parcela
TF: total de frutos cosechados

Determinación del color del fruto: se recolectarán frutos en diferentes estados de madurez y se compararán con la tabla Munsell para establecer colores definidos y posteriormente los grados de madurez. Por cada clon se elaborará una tabla de colores, teniendo en cuenta la siguiente tabla:

Tabla 8. Tabla de color

COLOR	DESCRIPCIÓN
COLOR 0	Fruto verde oscuro, maduro fisiológicamente
COLOR 1	Fruto con un 12 % de madurez, expresado en la corteza
COLOR 2	Fruto con un 25 % de madurez, expresado en la corteza
COLOR 3	Fruto con un 50 % de madurez, expresado en la corteza
COLOR 4	Fruto con un 75 % de madurez, expresado en la corteza
COLOR 5	Fruto con un 100% de madurez, expresado en la corteza del mismo

Determinación de la consistencia: esta prueba se realiza con la muestra con la que se elabora la tabla de color, que indica el grado de madurez. Con una navaja se extrae la corteza de la zona media y de menor coloración de cada lulo (cortes de 2 cm de diámetro). Con la mano izquierda se apoya el lulo sobre la mesa de trabajo y con la mano derecha se toma el penetrómetro poniéndolo en cero. Se coloca el penetrómetro en el centro del área descubierta (pulpa). Con el penetrómetro hace presión uniforme sobre el lulo hasta que entre la punta. Efectué la medida (lea la presión). Se repite la operación en los demás grados de madurez. Promedia los resultados obtenidos con los diferentes grados de madurez y elabora una gráfica con los datos de grados de madurez en el eje de las X y presión en el eje de las Y.
El penetrómetro es marca Bertuzzy. Ref: FT 327 que mide la fuerza de penetración de la corteza en Kgf o lbf.

Forma del fruto: se hará una descripción visual de la forma del fruto y podrán ser redondos, ovalados, achatados, otro. Esta evaluación se hará sobre la muestra de 6 frutos por parcela en grado de madurez 3 y 4.

Aroma: este es otro concepto sensorial cualitativo, se clasificara mediante la escala aromática que maneja la Productora de Jugos S.A: muy aromático, aromático, poco aromático, débil. Esta variable se realiza mediante el panel de degustación. Para la realización de dicha prueba, se requiere de frutos en grado de madurez 4, a los que se les hará un corte transversal. El aroma de cada fruto será analizado y concertado por el grupo de trabajo.

Espesor cascara (mm): a frutos en estado de madurez 3 y 4 se les hace un corte transversal y con un calibrador se le mide el espesor de la cáscara a cada uno de los frutos y al final se saca un promedio.

Diámetro ocupado de la semilla: a frutos en estado de madurez 3 y 4 se les mide el diámetro que ocupa la semilla en la pulpa y al final se saca un promedio.

Sabor del fruto: concepto sensorial cualitativo dado por el analista, se clasifica en muy ácido, acido, balanceado, no característico, residual químico. Esta variable se realiza mediante el panel de degustación conformado por equipo de trabajo de laboratorio. A cada uno de los miembros del equipo se le entregará una porción del 25 % de un futo en grado de madurez 4 para que sea degustado y emita su concepto según la escala.

Instrucciones para la degustación

1. La apariencia y el olor deben ser evaluados primero que el sabor.
2. No fumar en el transcurso del test.
3. Lavar la boca y tomar agua antes de probar la muestra
4. Tomar cantidades de la muestra suficientes para retenerla en la boca hasta percibir la caracterización analizada.
5. Tragar la muestra
6. Registrar las observaciones
7. En caso de estar evaluando más de una muestra, esperar hasta que todo el sabor haya desaparecido. Para esto consumir un poco de pan y luego enjuagar la boca.

Determinación del sabor del jugo: Pruebe la muestra de jugo e indique en la escala de abajo cuanto le gusto o disgusto el jugo tomado.

( ) Le gusto extremadamente
( ) Le gustó mucho
( ) Le gusto moderadamente
( ) Le gusto ligeramente
( ) No le gusto ni le desagrado
( ) Le desagrado ligeramente
( ) Le desagrado moderadamente
( ) Le desagrado mucho
( ) Le desagrado extremadamente

Describa lo que más le gusto y lo menos le gusto usted de la muestra .

Lo que más le gusto _____

Lo que menos le gusto _____

Determinación del color de la pulpa: a frutos en grados de madurez 3 y 4 se les hará corte transversal y la pulpa que se encuentra ubicada entre el área de la semilla y la cáscara se le compara el color con la tabla Munsell y se determina el código del color.

Peso cascara: a frutos en grados de madurez 3 y 4 se les separará cuidadosamente la cáscara de la pulpa del fruto y se hará la relación en términos de porcentaje.

% PC = PC * 100/ PF
% PC: porcentaje peso de la cáscara
PC: peso de la cáscara
PF: peso del fruto

Peso pulpa + semilla: es el peso del fruto menos el peso de la cáscara
% PPS= PPS*100/PF
PPS = PF – PC
PPS: peso de la pulpa más la semilla
PF: peso del fruto
PC: peso de la cáscara

Peso de semillas: 6 frutos sin corteza son sometidos a licuado, sin adición de agua durante 3 minutos, luego se cuela y se recoge el jugo el que se requiere para adelantar otras pruebas de calidad, la semilla que queda en el cedazo se somete nuevamente a licuado con adición de 200 cc de agua durante 1 minutos, luego se lava y se cuela nuevamente, posteriormente se pasa por un lienzo al que se le ejerce presión para tratar de sacarle la mayor cantidad de humedad y se pesa.

%PS = PS * 100/ PF
PS: peso de la semilla
PF: peso del fruto

Peso de la pulpa: es el resultado del pesaje de la pulpa más la semilla menos el peso de la semilla de 6 frutos por parcela en grado de madurez 3 y 4.
%PP= PP * 100 / PF
PP: peso de la pulpa = PPS – PS
PF: peso del fruto
Esta variable también se denomina % de rendimiento

Color de la pulpa: a la pulpa de cada una de las muestras por parcela se le comparará el color con la tabla Munsell y se determinará el código del mismo.

Oxidación y cambios de color: a cada una de las muestras de los jugos se le observarán los cambios de color al cabo de 30 minutos después de elaborados los mismos y se comparará con la tabla de color Munsell.

Grados brix: esta medición corresponde a la determinación del contenido de sólidos solubles totales**,** esta prueba se determina por el método refracto métrico y se expresa en grados brix. La lectura se debe corregir mediante la siguiente ecuación:
SST corr = 0.194 * A + SST
En donde:

A : % de ácido cítrico
SST: sólidos solubles totales en grados brix

Acidez titulable: se determina por el método de titulación potenciométrica. Se expresa como porcentaje de ácido cítrico y se calcula mediante la siguiente ecuación:

% ác cítrico = (V1 * N / V2) K * 100
En donde:
V1: volumen de NaOH consumido (ml)
V2: volumen de la muestra
K: peso equivalente del ácido cítrico (0.064 g/meq)
N: normalidad del NaOH (0.1 meq/ml)

En un frasco volumétrico se colocan 5 ml de jugo, se adicionan 100 ml de agua destilada y dos gotas de fenolftaleína al 1 % por medio de bureta. Luego se descarga NaOH 0.1 N utilizando una bureta y se deben anotar los ml consumidos.

Ratio: es la relación de grados brix/acidez, el rango es de 4 – 5.

pH: este se toma por medio de un peachimetro y el rango es de 2,8 – 3,5. Para estos análisis se utilizara el siguiente formato: cada que se haga una medición este debe ser calibrado con la solución indicadora.

Se toma jugo de cada uno de los lulos de la tabla de color, se enjuaga el electrodo ya calibrado con agua destilada, luego se sumerge el electrodo en la pulpa sin mezclar, después de un tiempo de estabilización se realiza la medición del pH.
Por último se realiza una gráfica indicando en el eje de las X el estado de madurez y en el eje de la Y el valor obtenido de pH. Es recomendable hacer varias mediciones durante el desarrollo del proyecto.

Senescencia o pérdidas por almacenamiento: a 4 frutos en estado de madurez 3 y 4 se les determina el peso y se dejan en un lugar fresco y sombreado a condiciones ambientales por espacio de 8 días. Los frutos deben ser marcados para tener en cuenta el peso específico de cada uno de ellos en las mediciones que cada dos días se realicen. Es importante hacer anotaciones sobre el deterioro del fruto como pérdida de turgencia, pudriciones, colonización de microorganismos de poscosecha. Es importante tener registro fotográfico en cada una de las observaciones.

2.2.19.3. Resultados y Discusión

Los materiales híbridos interespecíficos son los que presentan las mejores características organo sensoriales para propósitos agrindustriales, mientras que los tipo castilla tienen buenas características para mercado en fresco. Los materiales híbridos SEC31, PL11, PL19 y EC 28 presentan los valores más altos en grados brix, conversión de pulpa y rendimiento.

2.2.20. Evaluación de variables de rendimiento y calidad en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* lam en el departamento de Risaralda[38].

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

2.2.20.1. Marco Referencial

Bajo condiciones agroecológicas del Eje Cafetero, específicamente en el municipio de Santa Rosa de Cabal a 1600 msnm, con humedad relativa de 80.73%, precipitación de 2308 mm/año, temperatura de 19.46°C y brillo solar de 3.82 horas luz día, según Ramírez (2004), se evaluaron 15 materiales de lulo tipo castilla, provenientes de cinco eco regiones productoras de lulo del país correspondiente a los departamentos de Cauca, Huila, Nariño, Valle del Cauca y Risaralda. La evaluación de los materiales se hizo usando un diseño experimental en bloques completos al azar, con cuatro repeticiones y 15 tratamientos, cada tratamiento correspondió a un material de lulo, la unidad experimental estuvo conformada por 5 plantas, la distancia de siembra que se utilizó fue de 3 m entre plantas y 3 m entre surcos al triángulo.

Se analizó como parcelas divididas, los materiales fueron la parcela principal y los tiempos de evaluación las subparcelas, rendimiento, características físicas y químicas del fruto, presentaron diferencias significativas entre materiales. Se identificaron materiales con altos rendimientos la cual es una característica deseada por los agricultores.

2.2.21. Evaluación del contenido de materia seca y nutrientes en cada etapa de desarrollo de lulo hibrido la selva clon p 32 (*Solanum quitoense* lam *x Solanum hirtum*) en el municipio santa rosa de cabal, Risaralda[39].

Objetivo del proyecto (4): *"Evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados"*

---

[38] Jesús Zuleta Ospina[1], Cristian David Santacoloma Munera[2], Alonso González Mejía[3], Jaime Eduardo Muñoz Florez[4] ([1]Profesor Facultad de Ciencias Agrícolas UNISARC proyectosunisarc@gmail.com, [2]Estudiante de Agronomía Facultad de Ciencias Agrarias UNISARC, [3]Líder Frutas Tropicales CIAT, [4]Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira jemunozf@palmira.unal.edu.co.)

[39] Nicolás Alzate Ocampo, Jefferson Flórez Mejía, Victor Hugo Ramirez Builes y Jesús Zuleta Ospina

2.2.21.1. Marco Teórico

Con el fin de contribuir al conocimiento del crecimiento y la extracción de nutrimentos por lulo hibrido la selva clon P 32 (*Solanum quitoense* lam *x Solanum hirtum*), se realizó durante 11 meses una investigación en el municipio Santa Rosa de Cabal, Risaralda. La investigación se realizó en diferentes etapas de desarrollo de lulo hasta los 303 días después de siembra. Los resultados indican que el potencial de acumulación de materia seca por la planta son: En la etapa uno 27.13 g, en la etapa dos 85.8 gr, y en la etapa tres: 2364.8 g, lo que indica un contenido de agua de aproximadamente el 80%. La extracción de los nutrimentos por tanto, presenta una dinámica particular, lo que permite determinar las necesidades de la planta en cada etapa de crecimiento. Esta es la primera vez que se presenta resultados sobre la dinámica de crecimiento y distribución de la materia seca, enlazados con la extracción de nutrimentos en lulo en la zona cafetera. Los resultados obtenidos permitirán determinar la máxima eficiencia en el uso de los fertilizantes, que se traduzcan en un menor impacto sobre el medio ambiente y una mejor relación costo-beneficio para el agricultor.

El suministro de las cantidades y nutrientes necesarios del cultivo de acuerdo con su etapa fenológica, en la dosis correcta y en el momento preciso aumenta la productividad, produce mejores rendimientos, y reduce el uso indiscriminado de fertilizantes, razón por la cual el presente estudio está enfocado en obtener información sobre la extracción nutricional de lulo la selva en cada una de la etapas fenológicas, conociendo la concentración precisa de nutrimentos en los tejidos vegetales, y los nutrientes presentes en el suelo para saber qué cantidad de estos nutrientes se encuentra utilizando la planta, y así brindar herramientas a los agricultores en cuanto a nutrición se refiere, sobre dosis y momento de aplicación, para así aumentar los niveles de producción actualmente registrados, y disminuir el uso indiscriminado de fertilizantes.

El análisis químico de las hojas y otros órganos vegetales, llamado en general “análisis foliar” o “diagnóstico foliar”, es hoy un método práctico para estimar el estado nutricional y el requerimiento de sustancias nutritivas. La información que proporciona el análisis foliar complementa a la contenida en el análisis de suelo, integrando el conjunto de factores que influyen en la asimilación de los nutrientes, aporta las normas de fertilización, principalmente de microelementos, cuya disponibilidad en el suelo resulta difícil de determinar, confirmando las alteraciones nutricionales diagnosticadas visualmente, detecta los desequilibrios nutricionales que, sin tener una sintomatología específica se traducen en una reducción progresiva del vigor o la producción, y da a conocer hasta qué punto los nutrientes, presentes en el suelo o aportados mediante fertilización, son utilizados por la planta, para validar y corregir el plan de fertilización.
En la actualidad en la zona cafetera los programas de fertilización para lulo se basan en experiencias, y conocimientos empíricos. Risaralda empieza con su grano de arena para la contribución de la producción nacional iniciando con sus aportes investigativos.

2.2.21.2. Metodología

La investigación se realizó en La granja el Jazmín, ubicada en la vereda Guacas, municipio de Santa Rosa de cabal, ubicada en la cordillera central vertiente occidental entre lat. N 0º 55¨ y long W 75º 38¨ a una altura de 1.650 m.s.n.m., con una precipitación promedio anual de 2.305 m.m., con una temperatura media de 19.5 ºC, y 80.63% de humedad relativa; bajo condiciones normales (50% de probabilidad) (citados por Ramírez (2002).

Características generales del suelo en la zona

Santa Rosa de Cabal se encuentra dentro de la clasificación de los suelos derivados de cenizas volcánicas, dentro de los andisoles según la taxonomía de USDA (Soil Survey Staff, 1994), implica que el suelo tenga menos de 25% de carbono orgánico que además, cumpla tres requisitos de propiedades ándicas, como resultado de la presencia de cantidades significativas de complejos Al-humus, alófana, imogolita y ferhidrita. Estas propiedades son:(1) densidad aparente menor de 0.9 g/cm3, (2) retención de fosfatos mayor de 85%, y (3) aluminio más hierro extraídos con oxalato ácido de amonio mayor del 2%, esta unidad cumple dos de los requisitos de las propiedades ándicas y son por lo tanto andisoles típicos. Es importante conocer el contenido elemental presente en el suelo en el momento de realizar el análisis foliar para saber la cantidad de nutrimentos que ha tomado la planta dependiendo de la etapa fenológica en que se encuentre, además del manejo que se le dé al cultivo. (Henao T., M. C. 1997) (Tabla 1).

Análisis de suelos:

La muestra de suelos se tomó del área posible de nutrición de la planta (antes del establecimiento del cultivo), que posteriormente iba a ser ocupada por la copa productiva de la misma, a una profundidad de 20 cm y una distancia de 60 cm del sitio con respecto al tallo.

Recolección y selección de semilla:

La semilla fue obtenida de la finca Bombay, vereda el Higuerón en Palestina Caldas, la cual es reconocida por la gran demanda que tiene de semilla en la zona, se trabajó con el clon P32 material que hace parte de Lulo la selva y que está integrado por HFG y HO.

Tabla 1: Características generales de la zona

Localización geográfica	Condiciones climáticas
Santa Rosa de cabal, se encuentra ubicada en la cordillera central vertiente occidental entre lat. N 0º 55¨ y long W 75º 38¨ a una altura de 1.650 m.s.n.m.	Precipitación promedio anual de 2.305 m.m., con una temperatura media de 19.5 ºC, brillo solar promedio diario de 3.4 horas y 80.63% de humedad relativa; bajo condiciones normales (50% de probabilidad)(citados por Ramírez (2002).
Características generales del suelo	
El suelo contiene menos de 25% de carbono orgánico, densidad aparente menor de 0.9 g/cm3, retención de fosfatos mayor de 85%, y aluminio más hierro extraídos con oxalato ácido de amonio mayor del 2%, esta unidad cumple dos de los requisitos de las propiedades ándicas y son por lo tanto Andisoles típicos.	

Manejo Agronómico:

La investigación tuvo un manejó estándar de acuerdo al utilizado en la zona, en cuanto a preparación del terreno, fertilización, manejo de plagas y enfermedades, manejo de arvenses, cosecha, para lo cual algunas de las decisiones de manejo se tomaron basados en la respuesta del cultivo frente a las condiciones edáficas y climáticas que se presentaron durante el desarrollo de la investigación en la zona de estudio.

Registros Climáticos:

Se tomaron datos climáticos mensuales como temperatura (máxima, mínima y media), precipitación, humedad relativa, y radiación solar de la estación climática El Jazmín, ubicada UNISARC, entre la fecha de Mayo del 2008 a Marzo del 2009, para realizar el correspondiente análisis climático, con el propósito de evaluar la disponibilidad de agua en cada etapa del cultivo de lulo la selva, de acuerdo a la cantidad de agua acumulada en el suelo (aporte de lluvia) y de la extracción que hacen las plantas a través de la evapotranspiración, se decidió hacer un balance hídrico. El balance hídrico fue realizado basado en la metodología de Thorehm-Waite y Mather, en la cual se calculan valores de evapotranspiración a través de temperatura y humedad relativa diaria para la zona (Ramírez, B., V., 2004.).

Evapotranspiración.

La evapotranspiración potencial fue calculada a través de la siguiente fórmula: =1,21^n*(1-0,01*HR)+(0,21*Tº media)-1,8 donde:

- n =(7,45* Tº media)/(234,7+ Tº media),
- HR suma de cada uno de los valores registrados a las 7:00 am, 1:00 pm y 7:00 /3
- Tº media= Tº máxima + Tº mínima / 2

➢ TT (Tiempo Térmico)= (Tº máxima + Tº mínima / 2) –Tb (10ºC).

- TTA (Tiempo Térmico Acumulado)= suma de la temperatura térmica diaria acumulada, metodología de García y López modificada por Jaramillo. (citado por Ramírez, B., V., 2004.).

Con base en lo anterior se calculó el índice de humedad del suelo para esta localidad y consiste en la relación de la evapotranspiración real y la potencial (ETR/ETP); los valores varían de cero a uno (0-1), en donde 0 es un suelo con alta deficiente hídrica y 1 un suelo con buena disponibilidad de agua. La evapotranspiración potencial se considera como la máxima cantidad de vapor de agua que puede ser perdida por una superficie totalmente cubierta de vegetación y con suministro ilimitado de agua, y depende exclusivamente de las condiciones meteorológicas predominantes en cada zona. La evapotranspiración real se define como la cantidad de agua que sale hacia la atmosfera dependiendo del tipo de vegetación, condiciones edáficas del lugar y la etapa de desarrollo del cultivo (Ramírez, B., V.H; Gómez, M., O.F, 2005).

Manejo del cultivo

Antes de realizar el establecimiento del cultivo se realizó la toma de muestra del suelo para conocer el contenido elemental de este en ese momento, después de haber realizado este procedimiento las plantas se establecieron en el sitio definitivo sabiendo que los colinos tenían una altura de 15 cm, (Figura 1: vivero). La distancia de siembra fue de 3m x 4m para una densidad de siembra de 833 plantas por hectárea.

Después de haber realizado el trasplante en los diferentes sitios se hizo dos podas de formación una al primer mes de siembra y la otra al tercer mes que consistió en eliminar los chupones ubicados por debajo de la formación de la mesa de producción, (primera horqueta) para estimular el desarrollo de la planta y el crecimiento de ramas. Figura 2.

El manejo de plagas y enfermedades se realizó de acuerdo a la determinación de umbral de acción, integrando las diferentes alternativas de control cultural, biológico, microbiológico, fitoquímico, etológico y químico, en este se tuvo en cuenta el uso de productos permitidos, pertenecientes a las categorías toxicológicas 3A y 3B, descartando el uso grupos químicos como, carbamatos, organoclorados, órganofosforados, piretroides y pirazoles.

Fertilización del cultivo: La fertilización se efectuó con base en el manejo vigente de la zona a una distancia de la planta de 20 cm, con una fertilización homogénea.

Tutorado y amarre: se estableció al tercer mes de siembra el tutorado de la plantación, que consiste en el amarre vertical de las plantas por medio del amarre de los tallos con una fibra de polipropileno calibre 12.000 que se sostiene de un alambre galvanizado número 14, este va dirigido por tocones de guadua de 1.8 m de largo, ubicados a 3m uno de otro, los cuales cruzan cada surco de la plantación, esto para evitar el volcamiento de las plantas, ya que estas tienen un

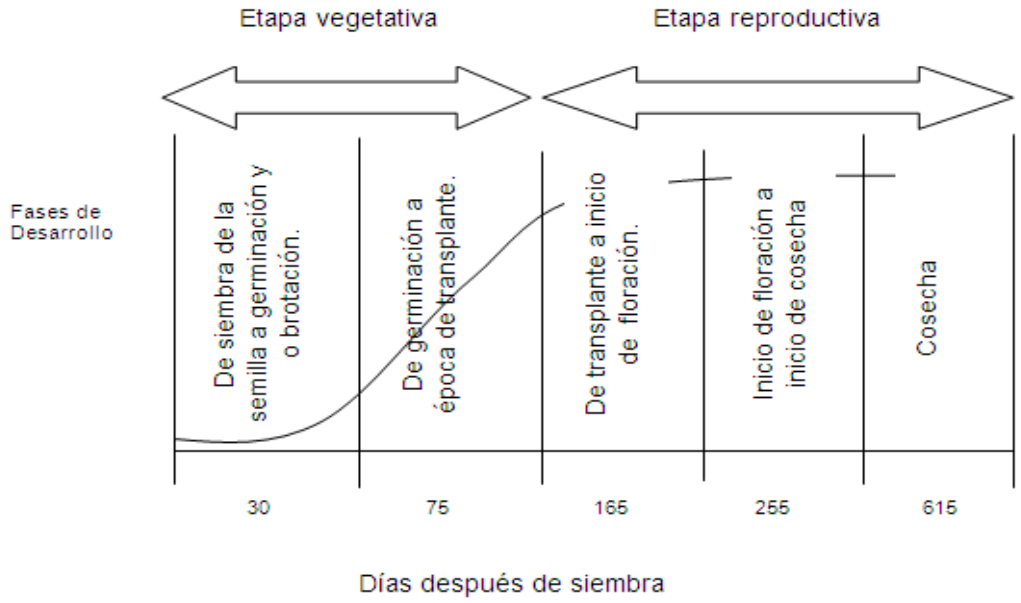
tallo voluble y altura que no se puede sostener por sí mismo. En el lote se realizó la diferenciación de las etapas vegetativas y reproductivas en que se encontraban las plantas para su correspondiente análisis así:

V1: Propágulo: se tomaron las muestras de raíz, tallo, y hojas, cuando el 51% de las plantas alcanzó 15 cm de altura.
R2: Inicio de floración: se tomaron las muestras de raíz, tallo, hojas, y flores cuando el 51% de las plántulas florecieron

R2: Llenado de frutos: se tomaron las muestras de Raíz, tallo, hojas, flores y frutos cuando en el 51% de las plántulas había un fruto con madures fisiológica.

Después de esta caracterización se procedió a elegir las mejores de acuerdo a las siguientes características: (Tabla2).

Tabla 2: Fases y etapas de desarrollo a tener en cuenta para el muestreo y análisis de tejido vegetal:



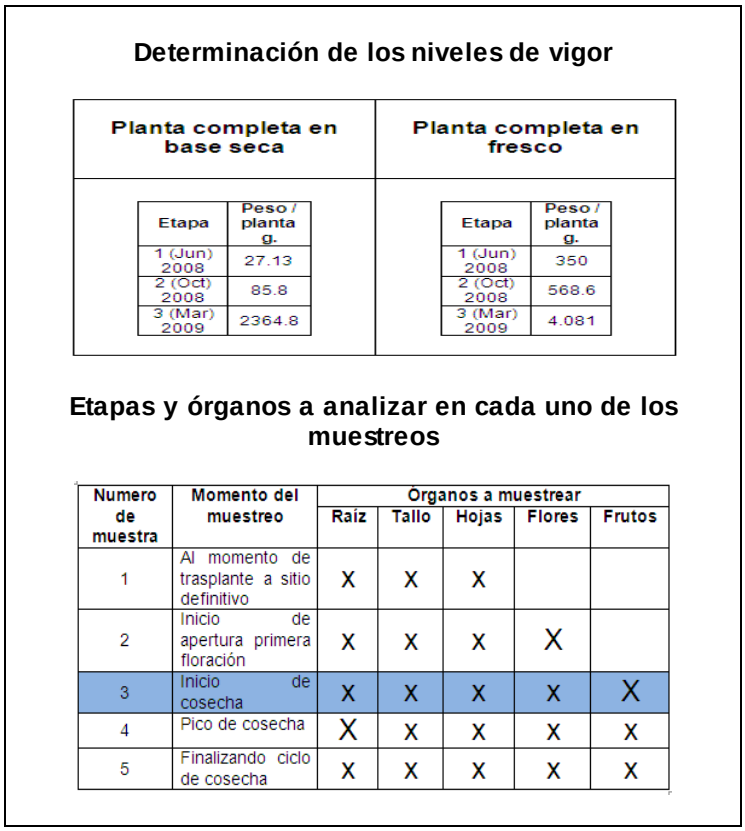
Después de esta caracterización se procedió a elegir las plantas de acuerdo a su contenido de materia seca: en la etapa uno con un peso en base seca de 27.13 g, y en fresco de 350 g, en la etapa dos 85.8 gr en seco y 568.5 en fresco, en la etapa tres: 2364.8 g y en fresco 4081 g respectivamente, de esta planta se tomaron cada una de las partes o muestras de la planta (raíz, tallo, hojas, flores o frutos) según lo indicó su etapa fenológica; además el muestreo por planta fue destructivo.

Según Angulo 2006, propone hacer muestreo en las etapas de vivero, inicio de floración, inicio de cosecha, pico de cosecha, y finalizando cosecha. Zuleta y

Baeza 2008 (Tabla 2) proponen analizar las mismas etapas en cada órgano de la planta según condiciones edáficas y climáticas de la zona.

Se envió 1 muestra por etapa de desarrollo (el cual contenía las partes anteriormente mencionadas según su etapa fenológica) para un total de 12 muestras en todo el proceso del proyecto. Los análisis de cada etapa de desarrollo fueron realizados de la siguiente manera:

El contenido de materia seca y nutrientes, se evaluó tomando muestras completas de los diferentes órganos de la planta (raíz, tallo, hojas, flores, y frutos), en diferentes etapas (Figura 1).



Determinación de los niveles de vigor

Planta completa en base seca		Planta completa en fresco	
Etapa	Peso / planta g.	Etapa	Peso / planta g.
1 (Jun) 2008	27.13	1 (Jun) 2008	350
2 (Oct) 2008	85.8	2 (Oct) 2008	568.6
3 (Mar) 2009	2364.8	3 (Mar) 2009	4.081

Etapas y órganos a analizar en cada uno de los muestreos

Numero de muestra	Momento del muestreo	Organos a muestrear				
		Raíz	Tallo	Hojas	Flores	Frutos
1	Al momento de trasplante a sitio definitivo	X	X	X		
2	Inicio de apertura primera floración	X	X	X	X	
3	Inicio de cosecha	X	X	X	X	X
4	Pico de cosecha	X	X	X	X	X
5	Finalizando ciclo de cosecha	X	X	X	X	X

Figura 1: Determinación de los niveles de vigor y etapas y órganos a analizar en cada uno de los muestreos

VARIABLES A EVALUAR

Materia seca:

El secado de la muestra fue hecho en el laboratorio de Cenicafé, donde se utilizó la siguiente metodología: La muestra se secó a 65°C durante 48 horas y luego se molió para las otras determinaciones. Los análisis se realizaron sobre la muestra seca a 105°C y los resultados se expresaron en base seca, restando el 100% del total de la muestra entre la división del peso seco y el fresco, (% Humedad= 100%-(Peso seco/ peso fresco)).

Contenido de nutrimentos por unidad de biomasa:

El contenido elemental de la planta se realizó en el laboratorio de la siguiente manera:

Preparación de las muestras para el análisis

Las muestras se limpiaron con un con atomizador y agua destilada; este lavado fue necesario en el caso de material vegetativo rastrero u otro material que puede estar en contacto con el suelo o salpicado por éste. (Carrillo, I. F. *et al* 1994).

No es recomendado tomar las muestras de árboles con deficiencias, ni con crecimiento anormal, ni hojas quemadas, ni afectadas por insectos, ni escogidas arbitrariamente. Deben ser al azar. Las muestras fueron tomadas de 8 a 11 a.m. No debe ser en día con lluvia ni días con mucho sol.
Tomada la muestra debe identificarse y guardarse en una bolsa plástica limpia. Evitar la contaminación con polvo, agroquímicos y otros.

El envío al Laboratorio para su correspondiente análisis debe ser lo más pronto posible. En caso de tener demoras será preferible un presecado al sol o en horno a baja temperatura (menos de 90°C). Si se guarda la muestra húmeda, es mejor desechar este muestreo y realizar otro nuevamente. (Carrillo, I. F. *et al* 1994).

- Se secaron las muestras a 65°C durante 48 horas. Cuando son quebradizas ya están secas.

- Las hojas secas se muelen en un molino tipo Wiley con malla No. 20 de acero inoxidable, o molino Cyclotec marca Tecator 1093 con malla de 0,5mm.

El material molido se empaca herméticamente en frascos de vidrio o de plástico, se identifica y se guarda. (Carrillo, I. F. *Et al* 1994).

La determinación de Nitrógeno se hace por el método de semimicro-Kjeldahl. Las determinaciones de Cl^{-1} y $SO^{=}_{4}$ por combustión en la bomba de Parr.
Las determinaciones de P, K, Ca, Mg, B, Fe, Mn, Zn, Cu y Al se realizan por vía seca después de incinerar la muestra en una mufla a 475°C. Las cenizas se disuelven en una solución ácida en la cual se hacen las determinaciones por colorimetría, absorción atómica, emisión de llama o espectroscopia de plasma.
La solución ácida contiene los elementos minerales que se encuentran en la muestra de hojas y la técnica que se seleccione para su determinación no debe influir en los resultados. Por tal razón, colorimétrica o espectrofotométricamente los niveles encontrados deben ser equivalentes y comparables. (Carrillo, I. F. *Et al* 1994).

Correlación entre la biomasa-nutrientes, y variables climáticas:

Este se realizó de acuerdo a los resultados que presentó cada uno de los análisis enviados al laboratorio (análisis de suelos y foliares), los cuales determinaron el contenido elemental de cada muestra, en cada etapa de desarrollo y presentes en el suelo.

En el momento de obtener cada uno de los análisis realizados por el laboratorio de Cenicafé, estos contienen información acerca de: fecha de muestreo, cultivo, zona, peso seco, peso fresco, cantidad de nutrientes contenidos por órgano de la planta, con esta información procedemos a determinar el contenido nutrientes por órgano dividiendo el contenido de peso seco entre el fresco y ese resultado se le resta al 100%, (total de la muestra).

Se multiplica el peso seco por el contenido que arroja el análisis por elemento y se divide entre 100 para así determinar la cantidad de gramos encontrados por parte de la planta. Se realiza una tabla de datos mostrando la cantidad de producto aplicado, y sus características (Dosificación. porcentaje del elemento aplicado), para conocer la cantidad elemental que absorbió la planta y la existente en el suelo, relacionando este muestreo con el análisis de suelos. Después de conocer estos resultados se procede a determinar la cantidad de elementos que consume el cultivo.

TOMA DE LAS MUESTRAS:

Desde el momento de la siembra hasta su primer análisis transcurrió 1 mes, lo que comprende la fase 1 de la investigación, donde se realizaron los muestreos destructivos de las 5 plantas correspondientes, para evaluar; la segunda fase de la investigación, se realizó a los 3 meses del primer análisis, extrayendo el equivalente a 5 plantas para su correspondiente muestreo y la tercera fase, se realizó al quinto mes del primer análisis contemplando cada uno de los procedimientos necesarios para realizar los análisis, mencionados anteriormente extrayendo la misma cantidad de plantas (Tabla 2). Después de haber realizado los anteriores pasos, una cantidad de la de la planta es pesada e introducida a un horno, con las especificaciones anteriormente descritas, para determinar su porcentaje de materia seca.

Las condiciones climáticas que se describen en la tabla 3, son condiciones de ecofisiologÍa del cultivo (datos en los cuales UNISARC y Corpoica reportan la misma información), acompañado de condiciones que se registraron desde la siembra hasta el inicio de madures fisiológica; como se puede observar durante el desarrollo del cultivo se presentaron unas condiciones climáticas, muy similares, en cuanto a temperatura, humedad relativa, y altitud, entre las observadas y la ecofisiologÍa del cultivo exceptuando la precipitación ya que como se puede observar se presenta un exceso hídrico de 1000 mm.

Tabla 3: Resumen de condiciones de ecofisiologÍa para el cultivo y condiciones climáticas que se presentaron durante el estudio.

Localidad	Temperatura Promedio °C	Humedad Relativa Promedio	Precipitación	
			Días	
			Con	Sin
El Jazmín	19,5	75%	203	100
	Min 15,5	Altitud	Total acumulado 3348 mm	
		1650 m.s.n.m.		
	Max 24,0			
Condiciones ambientales optimas para el desarrollo del cultivo				
Temperatura Promedio °C	Humedad Relativa Promedio	Precipitación	Altitud	
17-21ºC	50-70%	1700-2200 mm/anuales	1500-1800 m.s.n.m.	

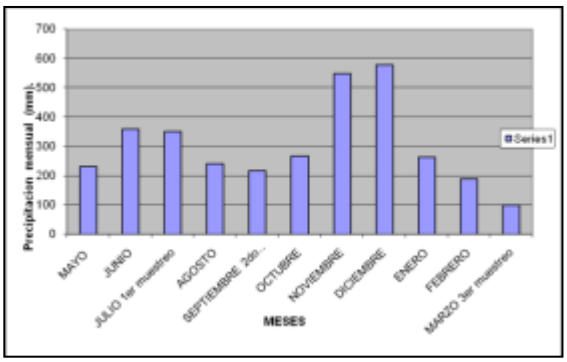
Comportamiento de las variables climáticas en el tiempo

En la figura 3 se presenta el comportamiento de la precipitación, durante los 11 meses de duración del proyecto, como se puede observar los meses de mayor precipitación noviembre y diciembre con 548 y 579 mm respectivamente, los de menor precipitación fueron los meses de septiembre de 2008 con 218 mm y febrero de 2009 con 189 mm (los meses de mayo y marzo son meses en los cuales se inició con toma de datos a partir del 9 del primer mes y el del segundo mes termino el día 7 de este). La precipitación acumulada durante los 11 meses de estudio fue de 3348 mm, la precipitación en condiciones normales en la zona es de 2305 mm anuales (Ramírez, 2004), la diferencia fue de 1043 mm, esto debido a que en esta época ocurrió el fenómeno “La niña” más fuerte de los últimos 50 años. Además se observa la precipitación diaria acumulada de cada uno de los muestreos realizados durante este estudio: 1er muestreo: 941mm, 2do muestreo: 1401 y el total de los 11 meses de muestreo, se destaca los 3348 milímetros registrados durante este tiempo (Figura 3). No se observa déficit Hídrico alguno debido a la gran cantidad de lluvia presente en el periodo del muestreo, el movimiento del agua en las plantas está regido por gradientes de potencial hídrico. La integración del concepto de potencial hídrico con las vías de flujo correspondientes ha originado el concepto del continuo suelo-planta-atmosfera, que constituye un modelo útil y unificado del flujo de agua desde el suelo hasta la atmosfera (Figura 3).

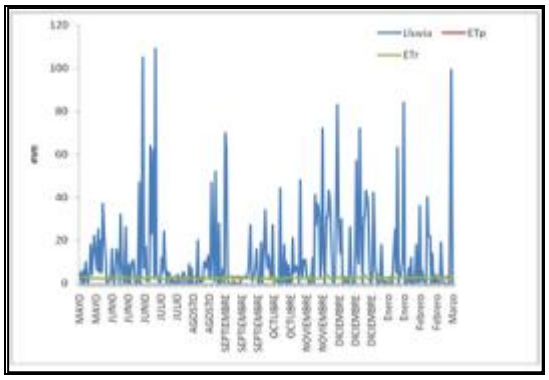
Se asume que un valor inferior de I.H.S. de 0.6 como crítico, se asocia con deficiencias hídricas para la planta, lo cual induce respuestas fisiológicas determinantes en el crecimiento y redistribución de los nutrientes asimilados. (Figura 3). En los meses de Junio, Julio y Agosto se presentaron los valores más bajos del índice de humedad de suelo que llegaron a 0.8 aproximadamente al contrario de los otros meses que la humedad se mantuvo por encima de 0.9, se puede observar que no se presentaron deficiencias hídricas durante el estudio, Ramírez en el 2004 reporta que para el cultivo de lulo, con suelo franco el valor

de lluvia critico en la etapa vegetativa es de 50mm mensuales para que el suelo tenga un I.H.S. critico de 0.6, y para su etapa reproductiva de 90mm mensuales, estos valores fueron sobrepasados durante el estudio. En cuanto al tiempo térmico, la cantidad de temperatura acumulada para alcanzar un desarrollo con las características de cada planta de estudio del primer muestreo fue de: 630.6 ºC, Para el segundo muestreo: 1682.9 y desde siembra hasta el inicio de madures fisiológica fue de 2953,35ºC.

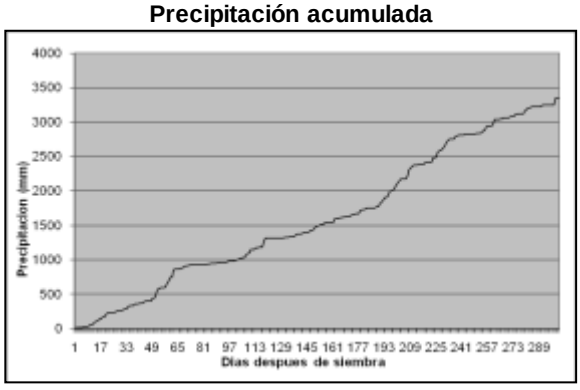
Comportamiento de la precipitación durante el desarrollo del estudio.



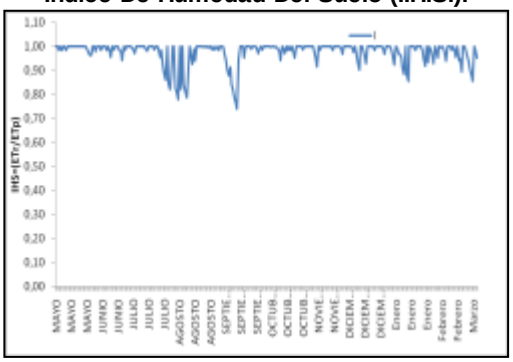
Balance hídrico.

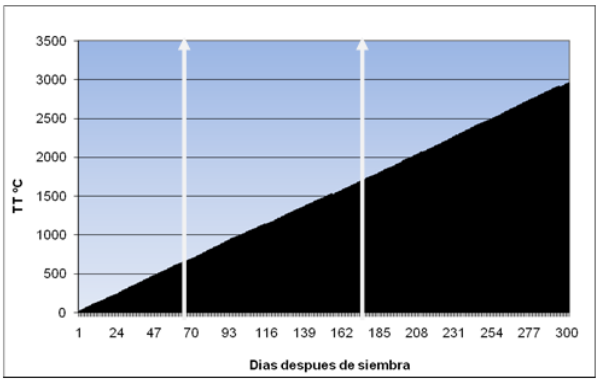


Precipitación acumulada



Índice De Humedad Del Suelo (I.H.S.).





Tiempo térmico acumulado

Figura 3: Comportamiento de la precipitación durante el desarrollo del estudio, balance hídrico, precipitación acumulada, índice de humedad del suelo, y tiempo térmico acumulado.

El conjunto de la oferta ambiental determina la forma como se acumula y distribuye la materia seca, lo cual tiene incidencia directa sobre la absorción y distribución de los nutrimentos:

ACUMULACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA MATERIA SECA:

La curva que describe el crecimiento de lulo la selva en términos del incremento en la materia seca total de la planta a través del tiempo, sigue un modelo exponencial**,** (Figura 4), el cual posee una etapa inicial de crecimiento lento, seguida de una etapa de crecimiento acelerado, teniendo en cuenta el contenido de agua de la planta en ese momento, ya que este es un componente mayoritario en las plantas (aproximadamente entre un 80-90% del proceso fresco en plantas herbáceas) que afecta directa o indirectamente, a la mayoría de los procesos fisiológicos. (Figura 4).

Figura 4: Acumulación de materia seca y peso fresco de la planta.

ABSORCIÓN DE NUTRIMENTOS:

En la zona de estudio el suelo presentó características físico-químicas de: textura franca, pH: 5.2, N: 0.4%, contenido de materia orgánica: 10.8%, K: 0.11 meq/100g, Ca: 0.8 meq/100g, Mg: 0.2 meq/100g, P: 29 mg/kg, Fe: 180 mg/kg, Mn: 78 mg/kg, Zn: 7 mg/kg, Cu: 9 mg/kg, B: 0.04 mg/kg. Se debe tener en cuenta además de la información del análisis de suelos la cantidad de nutrientes aplicados por etapa de desarrollo (Figura 2) y la cantidad nutrimentos que fue absorbido por la planta. De acuerdo a los resultados la cantidad de nutrientes presentes en el suelo en el caso de N fue mayor lo aplicado que lo absorbido por la planta, al igual que P, Zn, Cu, y B, en cuanto a K, Ca, Mg, Fe, y Mn las cantidades aplicadas son insuficientes para lo absorbido por la planta (Tabla 4).

Tabla 4: Cantidad de nutrientes por hectárea presentes en la zona de estudio, con relación a la cantidad total de nutrientes aplicados durante las 3 etapas de desarrollo vs los encontrados en los muestreos de plantas:

Elemento.	Cantidad kg/ ha.	Cantidad aplicada kg/ ha.	Cantidad absorbida por la planta kg/ha.	Eficiencia. %
Nitrógeno total	162	43,68452	37.6	86
P2O5	66.4	30,96245415	3.7	11
K2O	194	4,603332278	45.6	100
CaO	540	7,406895428	32.2	100
MgO	71,7	2,178095422	4.7	100
Hierro	324	0,020692931	0.16	100
Cobre	16.2	0,4137414	0.028	6
Zinc	12.6	1,360779464	0.08	5
Boro	0.072	0,547069732	0.03	5
Manganeso	140	0,013788066	0.03	100

La acumulación de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y B, en la primera etapa de crecimiento (fase lenta) que coincide con la etapa de crecimiento vegetativo inicial: (Figura 5): Se puede observar que los elementos que en mayores cantidades toma la planta para su fase vegetativa son el K, N y Ca, y en el caso de los elementos menores se encuentra el Fe en cantidades más elevadas frente a los otros nutrimentos.
En la etapa de floración se observa que la absorción de N, K y Ca aumentó considerablemente continuando con la tendencia del primer muestreo, y aumentó el consumo de Mg. (Figura 5).

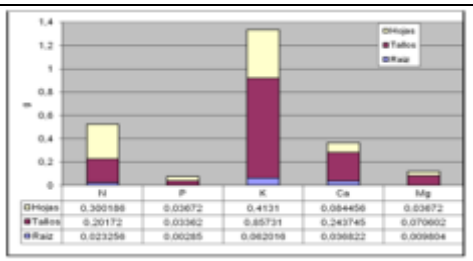
Generalmente la planta en la zona presenta deficiencias de Mg, en los análisis desarrollados durante el estudio (se puede observar que el consumo de Calcio por la planta es elevado, mientras que el de Magnesio es reducido Figura 4 y 5), la relación que existe entre estos dos elementos, es directamente proporcional ya que: El Magnesio se satura sólo del 5-20% de la CIC comparado con el Ca que se satura del 60-80% de la CIC en los suelos neutros. Para una buena nutrición se necesita una relación de Ca/Mg de 3/1 a 6/1 de la CIC respectivamente).
Al inicio de cosecha, que corresponde al tercer análisis la planta continua con la absorción en grandes cantidades de N, K y Ca, disminuyendo el consumo de P y Mg, y en cuanto a elementos menores aumenta el consumo de Fe y el de Zn. (Figura 5).

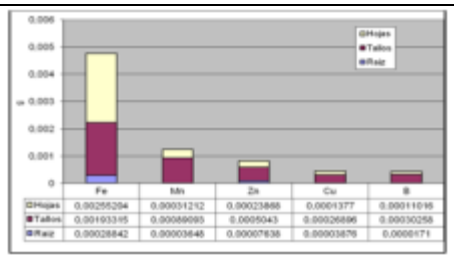
La cantidad de elementos absorbidos en mayores cantidades a los 303 días después de siembra, como se mencionó anteriormente son el Nitrógeno con 37.6 Kg/Ha, Potasio=45.6 Kg/Ha, Calcio=32.2 Kg/Ha después el Magnesio con 4.7 Kg/Ha y el Fosforo con 3.7 Kg/Ha (Figura 4 y 5).

En cuanto a elementos menores tenemos el valor más alto de absorción con él: Hierro: 0.16 Kg/Ha, en cantidades menores el Manganeso:0.03 Kg/Ha, Zinc: 0.08 Kg/Ha, Cobre:0.028 Kg/Ha, y Boro con 0.03 Kg/Ha (Figura 4 y 5), donde se puede observar que al día 63 se refiere a etapa de vivero: primer etapa, el día 173 a

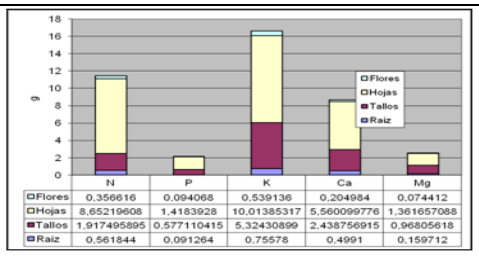
inicio de floración: segunda etapa, y el día 303 a inicio de madurez fisiológica tercer etapa.

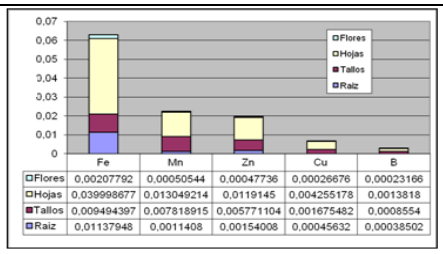
Absorción de nutrientes por cada parte de la planta. Primer muestreo (vivero).



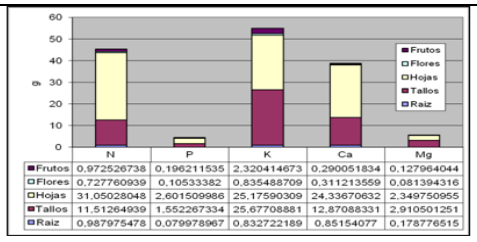


Absorción de nutrientes por cada parte de la planta. Segundo muestreo (Inicio de floración).





Absorción de nutrientes por cada parte de la planta. Tercer muestreo (Inicio de madurez fisiológica).



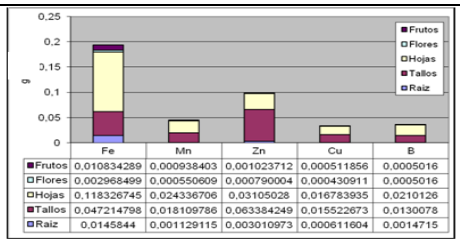


Figura 5: Absorción de nutrientes por cada parte de la planta primer muestreo (vivero), segundo muestreo (Inicio de floración), tercer muestreo (Inicio de madurez fisiológica).

En cuanto al consumo diario por cada planta del cultivo tenemos: Nitrógeno es de 0.188 gr/planta, de Fosforo 0.018 gr/planta, Potasio 0.225 gr/planta, Calcio 0.161 gr/planta y Magnesio 0.023 gr/planta, Hierro: 0.972 mg/planta, Manganeso: 0.999 mg/planta, Zinc: 0.912 mg/planta, Cobre: 0.914 mg/planta, Boro: 0.846 mg/planta (Figura 6).

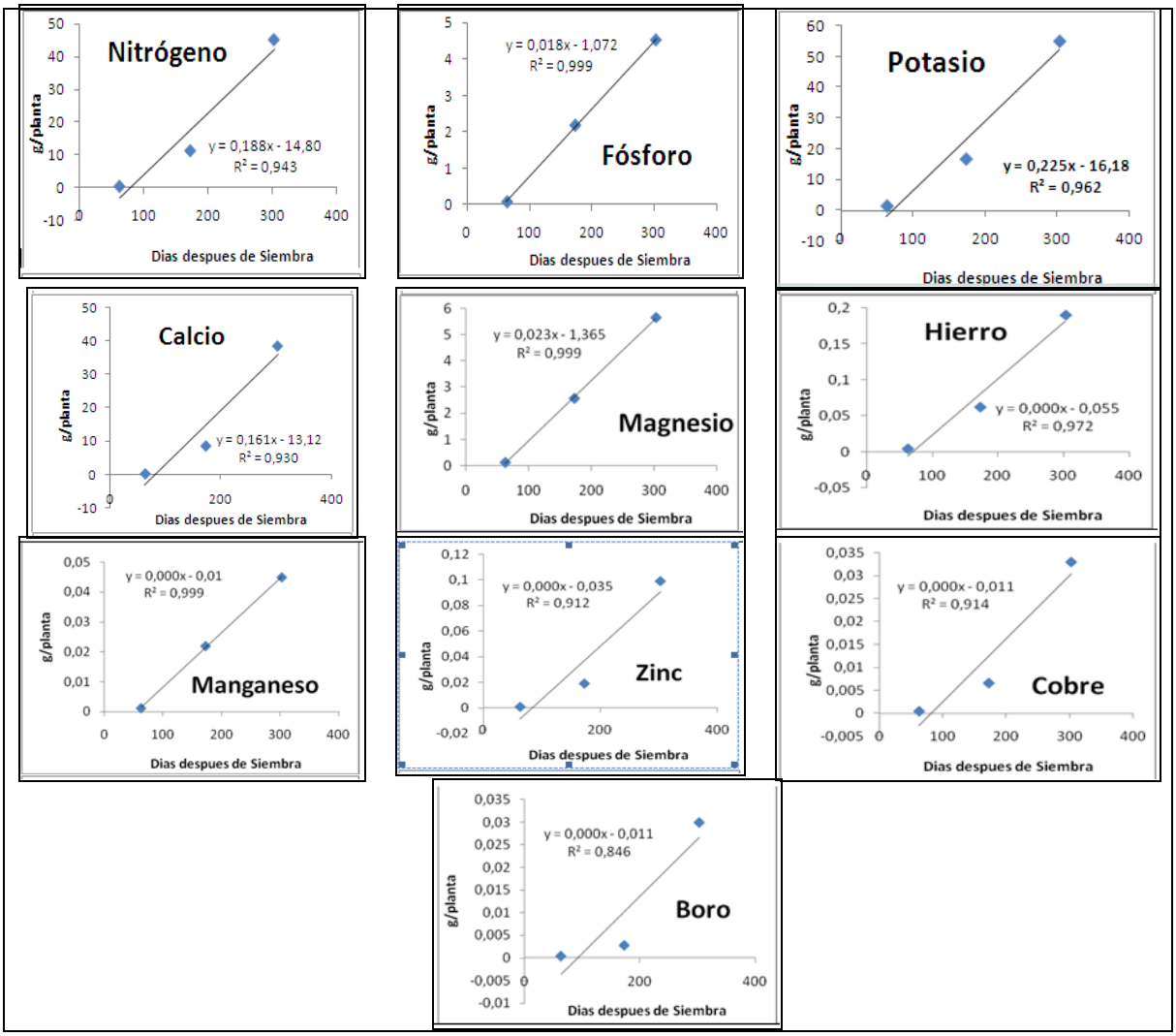


Figura 6: Absorción diaria de cada planta por elemento.

2.2.21.3. Conclusiones

- Lulo la selva es una planta que absorbe grandes cantidades de Potasio, Calcio y Nitrógeno, y que va aumentando su consumo con el paso del tiempo, por ende en el programa de fertilización a implementar se debe aplicar la cantidad necesarias por la planta de estos elementos para aumentar su productividad, sin olvidar que antes de iniciar con cualquier programa de establecimiento del cultivo de lulo, se debe observar que el lote a sembrar tenga los niveles óptimos de nutrientes, ya que este es el punto más importante en cuanto al programa de fertilización, para evitar intoxicación en las plantas por la aplicación exagerada de fertilizantes y las deficiencias nutricionales.

- Generalmente la planta en la zona presenta deficiencias de Mg, en los análisis desarrollados durante el estudio se puede observar que el consumo de Calcio por la planta es elevado, mientras que el de Magnesio es reducido,

probablemente el lulo tiene mayor afinidad por la absorción de Calcio y menor por la de Magnesio debido a que es evidente la absorción de la planta referente a estos dos nutrimentos. Existe alta susceptibilidad de la planta a las deficiencias de magnesio (la relación que existe entre estos dos elementos, es directamente proporcional; para una buena nutrición se necesita una relación de Ca/Mg de 1/1 a 6/1 de la CIC respectivamente).

- El exceso hídrico que se presento pudo limitar seriamente el potencial productivo al favorecer el incremento de enfermedades, influyendo también en pérdidas de nutrientes por escorrentía y lixiviación.

De acuerdo a los resultados la cantidad de nutrientes en el caso de N fue mayor lo aplicado que lo requerido por la planta, al igual que P, Zn, Cu, y B; en cuanto a K, Ca, Mg, Fe, y Mn las cantidades aplicadas son insuficientes para lo absorbido por la planta, por ende la planta debe tomarlo del suelo (Tabla 4).

2.2.21.4. Recomendaciones

- Se recomienda la realización de más investigaciones sobre el desarrollo vegetativo y productivo de lulo hibrido la selva (*Solanum quitoense* lam *x Solanum hirtum*) en las condiciones ambientales regionales, que conlleven a aumentar la producción para la zona.
- Evaluar zonas poco representativas de la zona central cafetera que tengan condiciones edafoclimáticas, semejantes a las regiones productivas de este cultivo.
- Igualmente se recomienda, la contextualización del desarrollo de producción en la cadena productiva para esta especie de acuerdo al escenario productivo mundial.
- Continuar con las dos siguientes etapas, para el desarrollo del proyecto.
- Antes de iniciar con el establecimiento del cultivo de lulo tener en cuenta la cantidad de nutrientes que contiene el suelo.
- Para realizar el establecimiento del cultivo se debe verificar que el suelo tenga las condiciones necesarias para su establecimiento de acuerdo a la fertilidad del suelo, y demanda ambiental, en el caso de no presentarse estas condiciones se debe realizar un plan de fertilización basado en la cantidad exacta de nutrientes que requiere el cultivo por etapa de desarrollo (Tabla 4).
- Para suplir la necesidad de P en lulo la selva se recomienda aplicar un fertilizante foliar, con las especificaciones que requiere el cultivo según su etapa de desarrollo (Tabla 4 y Figura 5 y 6).
- Con base a los requerimientos nutricionales del cultivo en cada una de las etapas de desarrollo, se propone un plan de fertilización mensual para esta zona, (Tabla 5).

- Tabla 5: Plan nutricional de lulo la selva clon p 32 (*Solanum quitoense* Lam *x Solanum hirtum*) propuesto para la zona cafetera por planta.

Mes / Producto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Urea 46-0-0	x	5 g	5 g	5g	5g	10g	10g	11g	13g	16g	18g
Cosmo-R 14-8-19	10g/l 10cc/planta	10g/l 10cc/planta	10g/l 10cc/planta	10g/l 50cc/planta	x		x	x	x	x	x
KCl 0-0-60	x	5 g	5 g	5g	5g	10g	12g	13g	15g	18g	20g
Sulcamag 0-3-0-25-13-8	x	5 g	5 g	10g	15g	20g	23g	30g	35g	40g	45g

2.2.21.5. Bibliografía

Ramírez, B., V.H; Gómez, M., O.F, 2005. Variaciones en el índice de humedad del suelo debido al fenómeno de "El Niño" y "La Niña" (ENSO) en el Departamento de Risaralda (Colombia). Investigaciones de Unisarc. Volumen 3 No. 1: Pág. 8-15.

Henao T., M. C. 1997. Caracterización de algunos suelos derivados de cenizas volcánicas de la zona cafetera centra de Colombia P 57-77.

Carrillo, I. F. *Et al* 1994. Manual de laboratorio para análisis foliares. P 52.

Potash & Phosphate Institute of Canada (PPIC), Manual Internacional de Suelos 1994.

Zuleta, O- J. 2006. Producción limpia de lulo. Corporación Universitaria Santa Rosa de Cabal.

2.2.22. Evaluación del efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis (*Colletotrichum spp*) en el cultivo de lulo la selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum)*[40]

Objetivo del proyecto (3): ***"****Desarrollar y evaluar estrategias de biocontrol de las plagas y enfermedades más importantes"*

2.2.22.1. Marco referencial

La antracnosis (*Colletotrichum spp*) es un problema limitante en el cultivo de lulo, que puede afectar hasta el 70% de la producción cuando las condiciones de clima son favorables y las prácticas de manejo son inadecuadas, por eso es importante

[40] Leidy Milena Romero Diaz
Juan Pablo Valencia Carvajal
Jesús Zuleta Ospina I.A

desarrollar nuevas alternativas de manejo de la enfermedad. El proyecto evaluó el efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis en plantas de lulo La Selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum) y* los productos fueron: un fungicida (QBL-FUN) y el regulador fisiológico (QBL-QUANTUM), relacionando la severidad de la enfermedad con respecto a las condiciones climáticas (humedad relativa, temperatura y precipitación). El estudio se desarrolló durante los meses de junio a diciembre de 2007 en el municipio de Palestina Caldas, sus objetivos fueron evaluar el efecto de los tratamientos sobre el comportamiento de la enfermedad con respecto a las condiciones climáticas dadas durante el desarrollo del proyecto y el rendimiento de la producción en cada uno de los tratamientos. Se utilizó un diseño en bloques completos al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron: T1 Testigo (score); T2 Testigo + FUN; T3 FUN; T4 FUN + QUANTUM y T5 Testigo + QUANTUM. Los resultados encontrados no generaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos con respecto a la severidad de la enfermedad y los rendimientos entre los tratamientos; las opciones tecnológicas evaluadas se compararon con moléculas químicas específicas para antracnosis. El análisis anterior permite decir que el T2 fue levemente superior al tratamiento testigo, que representa el manejo tradicional de antracnosis. En el tratamiento T5 la presencia de la enfermedad no afectó los rendimientos, sino que la planta soportó el ataque y presentó uno de los mejores rendimientos. El uso de QBL-fun y QBL-quantum genera una alternativa viable para el problema de antracnosis.

El lulo *Solanum quitoense,* es una fruta que ha tenido gran demanda y aceptación en el país; por esta razón es necesario desarrollar opciones tecnológicas que permitan mejorar los rendimientos de lulo y bajar los costos de producción, haciéndolo así rentable para el agricultor, amigable con el ambiente y a su vez ofrecer un producto de buena calidad al consumidor. Sin embargo, este cultivo es afectado por problemas causados por fitopatógenos en el cual se destaca *Colletotrichum spp* hongo que ocasiona la antracnosis, enfermedad común y destructiva.

La antracnosis (*Colletotrichum spp*) es uno de los problemas más limitantes del cultivo de lulo en la zona cafetera, que puede llegar a afectar hasta el 70% de la producción cuando las condiciones de clima y las prácticas de manejo son inadecuadas, por eso es importante desarrollar nuevas técnicas de manejo de la enfermedad. Es un patógeno que se ha convertido en un factor limitante para la producción de lulo, cada vez con mayor severidad, para ello es necesario buscar nuevos métodos y herramientas para el control de patógenos como la antracnosis, realizando una investigación de tipo explicativa del efecto de un fungicida (QBL-FUN) y un producto regulador fisiológico (QBL-QUANTUM), sobre la enfermedad producida por el hongo *Colletotrichum spp.* en plantas de lulo La Selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum).*

Teniendo en cuenta la tendencia de los mercados, especialmente los de exportación y conociendo que el lulo es una fruta en proceso de posicionamiento en mercados especializados que requieren de productos inocuos, esta

investigación contribuye al manejo agronómico en el marco de una agricultura limpia y competente, por eso se busca evaluar el efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis (*Colletotrichum spp)* en el cultivo de lulo La Selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum)* para determinar la severidad de la enfermedad con respecto a las condiciones climáticas (humedad relativa, temperatura y precipitación), evaluar el efecto de los tratamientos sobre el comportamiento de la enfermedad a través del tiempo durante el desarrollo del proyecto y el rendimiento de la producción en cada uno de los tratamientos.

Este trabajo se realiza como propuesta tecnológica eficaz e inocua para el manejo de antracnosis en la producción de lulo La Selva.

El estudio fue realizado en la finca Bombay en el municipio de Palestina Caldas, las condiciones climáticas durante el ensayo fueron: una precipitación de 2640 mm entre Mayo del 2006 y Abril del 2007 (Registro pluviométrico de la finca Bombay), temperatura de 20.9ºC, humedad relativa de 69.4%, brillo solar de 1679 horas/año (Estación meteorológica Naranjal, vereda Naranjal, municipio de Chinchiná Caldas, CENICAFE, 2007), msnm de 1350 m, el terreno circundante es ondulado-montañoso, pendiente de 41%, textura franco-arenosa, pH de 4.8, y la estructura del suelo es granular (BIOTEC, UNISARC, 2007). La vocación agrícola de la zona de estudio es cafetera, sus cultivos anteriores fueron café y plátano, en la actualidad esta zona está siendo utilizada para la producción de lulo La Selva con un tipo de tecnología bajo parámetros de producción limpia.

Los factores ambientales juegan un papel preponderante en el desarrollo de la epidemia. La duración de una lámina de agua tiene una influencia directa sobre la germinación, infección y crecimiento de *Colletotrichum* sp en los cultivos tropicales. Una alta humedad relativa influencia la esporulación, permite la germinación. Después de haber germinado, producen un apresorio y una clavija de penetración y se introducen directamente en los tejidos de su hospedero. La infección puede ocurrir en la ausencia de una superficie húmeda. La lluvia es uno de los factores que influencian fuertemente la dispersión del patógeno. (http://www.biblioteca.senavirtual. edu.co.2007)

2.2.22.2. Metodología

El presente trabajo se realizó en un cultivo de lulo La Selva en la finca Bombay vereda el Higuerón en el municipio de Palestina Caldas. Esta finca tiene un área de 9 hectáreas, está ubicada a 1320 msnm, temperatura de 18ºC, humedad relativa de 85%, una latitud de 4º 54’ 54’’ N, una longitud 75º37’48’’ w. La información climática se obtuvo de la estación meteorológica Naranjal ubicada en la vereda Naranjal, del municipio de Chinchiná Caldas, 2007, propiedad de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Plantas de lulo la selva, QBL-FUN, QBL-QUANTUN, Score, Inex A, tijera podadora, navaja, bisturí, GPS, bolsas plásticas, canastillas, aspersora,

computador, libreta de campo, Cosmoaguas, Cosmo flux 411 f, lupa, cámara digital, test para análisis de pH y dureza del agua, pluviómetro y plástico.
Se realizó una investigación de tipo explicativa del efecto de diferentes metabolitos intermedios (un fungicida (QBL-FUN) y un producto regulador fisiológico (QBL-QUANTUM)) sobre la enfermedad de antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum* sp en plantas de lulo La Selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum).*

El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cinco tratamientos y 4 repeticiones, la población total del experimento fue de 200 plantas y cada unidad experimental constó de 10 plantas. El área de cada parcela fue de 37.5 m², el de los bloques de 187.5 m² y el área del experimento de 750 m², a una distancia de 2.5 m entre surcos y 2.5 m entre plantas en el sistema de triángulo.

Los tratamientos utilizados en el proyecto fueron los siguientes: (ver tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el proyecto

Tratamiento	Dosis	Producto
1	0.2 l/ha	Testigo (score)
2	0.2 l /ha + 2 l/ha	Testigo + FUN
3	2 l/ha	FUN
4	2 l/ha +0.5 l/ha	FUN + QUANTUM
5	0.2 l /ha + 0.5 l/ ha	Testigo + QUANTUM

Los tratamientos propuestos fueron el resultado de la aplicación de las dosis comerciales recomendadas por los fabricantes de los productos y algunas mezclas de productos buscando la interacción y el efecto sobre la enfermedad de la propuesta orgánica y química.

Los procedimientos realizados fueron los siguientes:

Instalación del ensayo: el presente trabajo se instaló en un cultivo comercial de lulo La Selva con 5 meses de edad y que se encontraba en la fase de desarrollo II que va de inicio de floración a inicio de cosecha, en el momento el cultivo estaba en llenado de fruto y con presencia de la enfermedad (antracnosis) causada por *Colletotrichum* spp.

Utilizando el diseño experimental descrito anteriormente, cada parcela se identificó con su respectivo tratamiento y repetición (figura 1). Se hicieron dos aplicaciones continuas de cada uno de los tratamientos con un intervalo de 15 días y a partir de éstas, dos aplicaciones con intervalo de un mes.

Figura 1. Identificación de las unidades experimentales

Variables a evaluar

Severidad vs condiciones climáticas: humedad relativa, temperatura y precipitación. Se realizaron evaluaciones quincenales de severidad de la enfermedad, información que fue registrada en un formato (ver tabla 2).

La metodología empleada consistió en la relación entre la severidad con las condiciones climáticas de la zona de estudio, tomando como base los datos reportados por la estación meteorológica Naranjal.

Comportamiento de la enfermedad: en cada uno de los tratamientos a través del tiempo y durante el desarrollo del proyecto se procedió a hacer una evaluación fitosanitaria quincenalmente, para establecer el comportamiento de los diferentes tratamientos, contando el número de frutos de la posición a evaluar en la planta, la severidad de acuerdo al diagrama estándar del grado de severidad de antracnosis. Después de evaluadas todas las plantas se midió el porcentaje de severidad por tratamiento, aplicándose la fórmula anteriormente descrita. La información obtenida se registró en el siguiente formato (Tabla 2).

Tabla 2. Formato de registro de información sobre la severidad de *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de lulo La Selva

Parcela	Tratamiento	Plantas evaluadas	Posición evaluada	No. De racimos	Frutos totales	Frutos evaluados	Severidad

Análisis de la información: los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y las comparaciones se hicieron mediante la prueba de Tukey. La información se corrió en el programa S.A.S y los resultados fueron comparados entre los tratamientos y estudios previos sobre manejo de antracnosis con tecnologías limpias.

Determinación de la línea base: La metodología descrita de toma y registro de levantamiento de información fitosanitaria se aplicó para establecer la línea base contando el número de frutos de la posición a evaluar, de allí se sacó el 10% de

éstos y se registró la incidencia y severidad, después de realizada la evaluación se procedió a calcular el porcentaje de incidencia y severidad.

VARIABLES EVALUADAS

Incidencia y severidad de la enfermedad con respecto a las condiciones climáticas: la variable incidencia sólo se registró para efecto del levantamiento de la línea base, mientras que la severidad fue registrada quincenalmente durante el desarrollo del proyecto.
La evaluación de la severidad partió de lo encontrado en la línea base que correspondió a la primera evaluación y es el indicador de la situación existente antes de empezar a aplicar cada uno de los tratamientos

Se realizó una correlación entre la severidad y los factores climáticos tales como temperatura, humedad relativa y precipitación (tabla 3).

El hongo es favorecido por elevada humedad relativa (más de 82%), alta precipitación y temperaturas oscilantes entre 22 y 32 grados centígrados. (Redondo, 2003).

De los tres elementos del clima correlacionados con la severidad, la precipitación fue la que mayor correlación presentó en todos los tratamientos y la temperatura fue la que menor correlación presentó (Tabla 3).

Se puede observar que tanto la humedad relativa como la precipitación fueron directamente proporcional a la severidad, por el contrario la severidad se comportó de manera inversa frente a la temperatura siendo los tratamientos 3 y 4 los que tuvieron mayor correlación con la precipitación lo cual indica que aunque el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, en los tratamientos 3 y 4 la acción de los productos QBL-FUN y QBL-QUANTUM se pudo ver afectada por altas precipitaciones.

Se puede concluir que es una alternativa innovadora para el manejo de antracnosis *(Colletotrichum spp*) en lulo La Selva *(Solanum hirtum* por *Solanum quitoense*), buscando inocuidad alimentaria del producto sin comprometer los rendimientos del cultivo, como se puede observar que todos los tratamientos incluyendo el testigo comercial se comportaron con una supresión igual al no encontrar diferencias estadísticas significativas. Por lo anterior se concluye que el uso de metabolitos intermedios son alternativas viables para facilitar el manejo de la enfermedad en una agricultura limpia.

El análisis de varianza indica que no hay diferencia estadística entre los tratamientos ni entre los bloques.

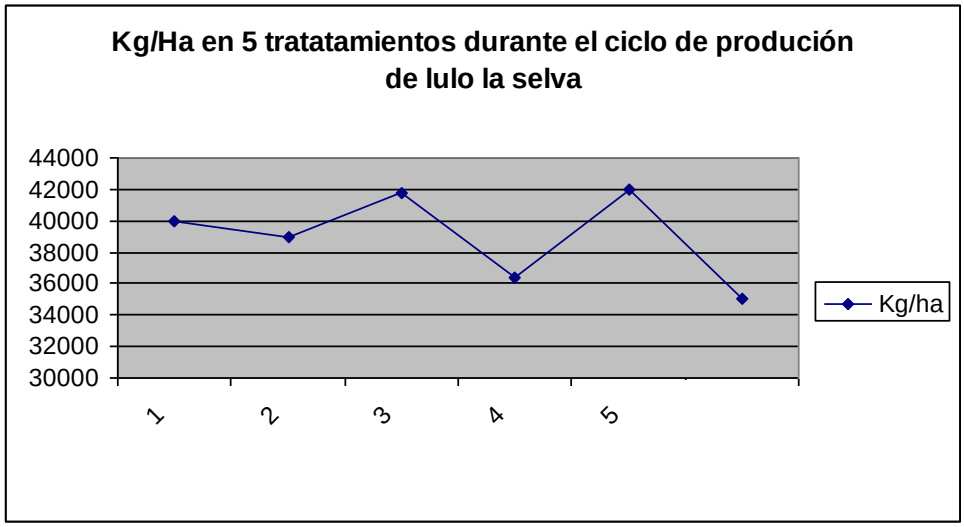
El soporte de salida del software estadístico SAS se hizo una transformación de los datos, se sacó su raíz cuadrada, pero los resultados no cambiaron.

Se concluye que según este análisis no existe evidencia estadística que exista efecto de los tratamientos sobre la variable producción.

Tabla 3. Correlación entre severidad y factores climáticos

Severidad			
TRATAMIENTOS	**Temperatura**	**Humedad Relativa (%)**	**Precipitación (mm)**
Tratamiento 1 (Testigo (score))	-0,85100579	0,83503367	0,73930083
Tratamiento 2 (Testigo + FUN)	-0,86346958	0,75383155	0,80980892
Tratamiento 3 (FUN)	-0,72009829	0,50122331	0,78814739
Tratamiento 4 (FUN + QUANTUM)	-0,70286212	0,51962224	0,91082165
Tratamiento 5 (Testigo+QUANTUM)	-0,844962	0,77821445	0,6632279

Grafica 1. Rendimiento durante el ciclo de producción de lulo La Selva



El análisis que se hace muestra las variantes en rendimiento con relación a tres supuestos así:

a) Incremento o decremento de la producción con relación al tratamiento testigo: el tratamiento 2 (Testigo + QBL fun) y el tratamiento 4 (Testigo + quantum) muestran que sus rendimientos estuvieron por debajo de lo reportado por el tratamiento testigo (score), siendo insignificante para T2 y significativo para el T4, mientras que el comportamiento de los tratamientos T3 (QBL Fun) y T5 (Testigo + quantum) en cuanto al rendimiento fue levemente superior, sin ninguna significancia.

b) Incremento de la producción con relación al tratamiento de más bajo rendimiento: el más bajo rendimiento se obtuvo con el tratamiento 4 y el reporte de los T1, T3 y T5 fueron 11.61, 16.43 y 15.96 respectivamente son significativamente importantes.

c) Incremento o decremento de la producción con relación a una parcela comercial: los resultados obtenidos en este análisis es muy similar a lo expresado con relación rendimiento obtenido en el T4

Teniendo en cuenta que no hubo diferencias significativas del rendimiento entre los tratamientos, el análisis anterior permite decir que los T3 y T5 fueron levemente superiores por encima del tratamiento testigo, el cual representa el manejo que los productores le hacen tradicionalmente a antracnosis en el cultivo de lulo en la zona de estudio.

El uso de QBL fun y QBL quantum genera una alternativa de manejo viable para el problema de antracnosis ya que para el caso de T5 donde la enfermedad presentó la severidad más baja, también coincide con los mejores rendimientos, algo muy similar pasó con el tratamiento T3, a diferencia que la presencia de la enfermedad no afectó los rendimientos, sino que la planta soportó el ataque y presentó el segundo mejor rendimiento.

Se puede decir que el efecto sinérgico entre el Qbl Quatun y la molécula química se potencializaron, lo que vio reflejado en que fuera el tratamiento de más baja severidad de la enfermedad y más altos rendimientos.

2.2.22.3. Conclusiones

Todos los tratamientos controlan problemas de *Colletotrichum sp* en lulo La Selva, lo cual es muy interesante si se tiene en cuenta que el tratamiento 1 es control químico y que no existe un testigo absoluto, lo cual indica que el QBL-FUN y el QBL-QUANTUM son productos para tener en cuenta dentro de un manejo integrado de hongos fitopatógenos.

QBL FUN Y QBL QUANTUM se convierten en una gran opción para estructurar nuevos paquetes tecnológicos con énfasis en producción limpia.

Este trabajo es muestra que el uso de extractos vegetales como QBL FUN Y QBL QUANTUM son una buena opción para el tratamiento de problemas fitosanitarios como es la antracnosis (*Colletotrichum* sp) corroborando el trabajo realizado por Veloza et al, publicado en el IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado 2002 donde hicieron un estudio sobre el manejo biológico mediante el uso de extractos de plantas para el control de la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea*) en mora (*Rubus glaucus*).

Las condiciones climáticas que se presentaron durante el estudio, pudieron haber afectado los resultados de la investigación.

2.2.22.4. Bibliografía

Antracnosis. 2007. http://www.biblioteca.senavirtual.edu.co

BIOTEC, Corporación para el Desarrollo de la Biotecnología y UNISARC, Corporación Universitaria de Santa Rosa de Cabal. Monitoreo y registro de condiciones edafoclimáticas en fincas de productores e implementación de calendarios agrícolas para fortalecer la agricultura específica por sitio en lulo y mora. 2007

REDONDO, A. 2003. Tecnologías sostenibles para el manejo de la antracnosis (C*olletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. & sacc) en papaya (C*arica papaya*) y mango (M*angifera indica*). Boletín técnico Nº 8. Valledupar. http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Manejo%20de%20la%20 antracnosis%20en%20mango.pdf .2007.

VELOZA. 2002. Manejo biológico mediante el uso de extractos de plantas de la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea*) en la mora (*Rubís glaucus*) en condiciones de laboratorio. IV Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado. 2002.

ZULETA, J. Ramírez, V y Betancourt, M. Antracnosis o pudrición seca del fruto. Cartilla producción limpia de lulo. Pág 39. Diciembre 2003.

2.3. RESULTADOS TRANSVERSLAES

2.3.1. IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE PLANTAS IN VITRO DE LULO A BAJO COSTO CON PRODUCTORES.

Objetivo del proyecto (5): "*Fortalecer la capacidad de agricultores y técnicos en el manejo integrado de los cultivos de mora y lulo y desarrollar capacidades de innovación en los actores de las cadenas productivas".*

Se implementó en el municipio de Belén de Umbría, departamento de Risaralda (Colombia), un laboratorio de producción de plantas *in vitro* de lulo a bajo costo con el objetivo de capacitar y empoderar a pequeños agricultores en esta técnica para que ellos sean sus propios proveedores del material de siembra para establecer sus cultivos. En este sentido, se realizaron visitas a cada una de las asociaciones que mostraron interés, con el fin de seleccionar los grupos de productores para implementar el laboratorio. Después de evaluar la capacidad organizativa y compromiso de sus asociados, se seleccionaron ASLUBEL en Belén de Umbría y ASOLULOS en Santa Rosa de Cabal.

En los laboratorios de CIAT se ajustó el protocolo de propagación para que pudieran ser aplicados en condiciones rurales a menor costo, se capacitó personal de la organización para que fueran ellos los que generaran la producción masiva y se hizo seguimiento a sus actividades. Con la estrategia implementada en este proyecto se logró disminuir los costos de inversión en equipos equivalente a un 83%, pasando de $25.850.000 (pesos) a $4.350.000. De igual forma se redujo el costo de infraestructura locativa, pues la Alcaldía otorgó en comodato el local para el laboratorio. Fue necesario invertir $2.000.000, en adecuaciones eléctricas e hidráulicas. Esto permanecerá válido siempre y cuando la Alcaldía continúe apoyando a la asociación de productores.

Se construyó una Cámara de flujo laminar, partiendo del diseño que CIAT ha usado en la implementación de laboratorios rurales de cultivo de tejidos (Roosevelt Escobar y su equipo). El costo de esta cámara de flujo laminar fue $980.000 pesos, mientras que el costo de una cámara comercial es de $4.000.000 (pesos) o más. Esto representa una reducción en costos del 75%.

El crecimiento proyectado de la demanda industrial de lulo, y el surgimiento de híbridos interespecíficos para el consumo en fresco, pronostican una demanda alta de material de siembra propagado clonalmente. La oferta de material de siembra actual es reducida, indicando que la viabilidad del laboratorio aquí fortalecido puede estar asegurada. Obviamente, muchos factores fuera del control de los investigadores influyen en la viabilidad comercial de este negocio. No obstante, con la tecnología actual implementada en el proyecto se da inicio a una actividad que tiene el potencial para crecer en el futuro cercano.

El laboratorio establecido en Belén de Umbría es una alternativa de bajo costo. El aporte en Infraestructura ofrecido por la Alcaldía Local ha permitido el desarrollo del laboratorio en condiciones apropiadas y técnicamente viables. El laboratorio se encuentra en producción; sin embargo aún quedan varios aspectos por ajustar y mejorar, lo cual se logrará con el acompañamiento por parte del CIAT, u otra entidad, hasta lograr una mayor autonomía en la producción.

Los detalles del establecimiento del laboratorio se muestran en el *Anexo 2 Implementación de un laboratorio de producción de plantas in vitro de lulo a bajo costo con productores.*

2.3.2. SOCIALIZACIÓN DEL PROYECTO Y FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES

Objetivo del proyecto (1): *"Con la participación de los agricultores, empresas comercializadoras y procesadoras seleccionar materiales élite de lulo y mora, con criterios de adaptabilidad, resistencia a enfermedades, productividad y aceptación del mercado".*

Objetivo del Proyecto (5): "*Fortalecer la capacidad de agricultores y técnicos en el manejo integrado de los cultivos de mora y lulo y desarrollar capacidades de innovación en los actores de las cadenas productivas"*

Con los resultados de este proyecto se fortalecieron las capacidades del recurso humano involucrado, mediante la generación y divulgación del conocimiento científico, tecnológico y de innovación. Se logró la apropiación de algunas tecnologías generadas que permitirán mejorar los sistemas productivos de mora y lulo, y en consecuencia la calidad de vida de los actores involucrados en estas cadenas.

Se realizaron 33 eventos de capacitación y divulgación de los resultados en los cuales participaron alrededor de 1713 personas. Se cuenta con guías metodológicas para la producción limpia de lulo y mora. Se desarrollaron 36 trabajos de investigación como tesis de pregrado, maestría y doctorado, 20 publicaciones entre artículos científicos (Algunos se encuentran en proceso de publicación), cartillas, guías y póster.

Algunas metodologías generadas fueron: umbrales de acción, caracterización organoléptica con fines de mercado agroindustrial, escalas y gráficos de severidad para las principales enfermedades de lulo, métodos de propagación vegetativa de mora de castilla, Caracterización de la resistencia de especies silvestres de solanáceas a nematodos y fusarium, métodos de injertación, afinidad y compatibilidad de naranjilla de jugo injertada en portainjertos silvestres, caracterización de resistencia en campo de naranjilla de jugo injerta en patrones silvestres, selección de una nueva variedad de naranjilla de jugo, caracterización fisicoquímica de materiales promisorios de naranjilla y manejo de nutrientes por sitio específico en naranjilla, entre otros (Anexo 3. *Estadísticas eventos y talleres Fontagro mora lulo*).

2.3.3. SISTEMAS DE INNOVACIÓN FUNCIONALES PARA LAS CADENAS DE LULO Y MORA DE COLOMBIA Y ECUADOR ESTABLECIDOS, CONSOLIDADOS Y FORTALECIDOS

Objetivo del proyecto (6): "*Establecer y fortalecer sistemas de innovación para el desarrollo de los cultivos de mora y lulo en Colombia y Ecuador".*

La implementación de sistemas de innovación funcionales para las cadenas de lulo y mora de Colombia y Ecuador, se realizó utilizando las metodologías de *Gestores de Innovación en la Agroindustria Rural – GIAR, (Conocimiento del Mercado, la Brújula para la Innovación),* la cual se enfoca en mejorar procesos de innovación dentro de las cadenas productivas con la participación de representantes de los actores involucrados. La otra metodología usada fue *Diseño de Estrategias para Aumentar la Competitividad de Cadenas Productivas con Productores de Pequeña Escala* que tiene como objetivo construir de forma participativa con los diferentes actores de la cadena un plan de acción estratégico para aumentar la competitividad.

La primera metodología sirvió como base para constituir un grupo representativo de los actores por cadena productiva seleccionada, los cuales estuvieran interesados en participar del proceso y tener iniciativa por aprender cosas nuevas. Esto les permitió adquirir conceptos básicos sobre cadenas de valor, así como habilidades para implementar procesos de innovación. La segunda fue la herramienta que permitió realizar un proceso estructurado de planificación dentro de la cadena donde la participación activa la lideró el grupo representativo seleccionado de la cadena.

En Colombia se trabajó con los productores de lulo de la asociación ASLUBEL en Belén de Umbría (Risaralda) y la asociación APROMORA en la vereda Montecristo (Pitalito, Huila). Se inició con la identificación de los principales problemas en las cadena productivas, los cuales fueron a) débil gestión empresarial, b) poca productividad y c) malas prácticas en poscosecha). Una vez identificadas estas limitantes se siguió con los procesos de la metodología para lograr la implementación del sistema. El éxito se basó en el conocimiento previo del socio local sobre la metodología, el apoyo durante el proceso por parte del socio local a los beneficiarios, el interés por aprender y aplicar los conocimientos en su vida cotidiana por parte de los usuarios, el aporte en especie por parte de los beneficiarios y la apropiación total de la metodología por parte del grupo GIAR.

En Ecuador se trabajó con las siguientes asociaciones de productores: ASOFRUT, YANAHURCO, EL BELÉN, LA AMISTAD, AGROVIDA, SANTA LUCÍA y como empresa transformadora con PLANHOFA. Los problemas identificados fueron: a) altos costos de producción, b) bajo acceso a capital, c) débil calidad en el servicio de asistencia técnica, d) inestabilidad de los precios de venta en el mercado y e) no existe una organización empresarial de productores de mora. Una vez identificadas estas limitantes se siguió con los procesos de la metodología para lograr la implementación del sistema. El éxito se basó en el conocimiento previo del socio local sobre la metodología, el apoyo durante el proceso por parte del INIAP a los beneficiarios, el acompañamiento de personal del ministerio de agricultura y otras instituciones públicas, y la apropiación de productores líderes y comercializadores locales.

Esta experiencia causó gran impacto porque pudo generar en poco tiempo (2 años) procesos de autogestión, de co-innovación entre los actores y toma de decisiones por parte de las asociaciones tanto en Colombia como en Ecuador. Los detalles del proceso se muestran en el *Anexo 4 Gestores de Innovación en la Agroindustria Rural-GIAR.*

2.3.4. LÍNEA BASE LEVANTADA PARA LOS CULTIVOS DE MORA Y LULO EN COLOMBIA Y ECUADOR

Se levantaron las líneas base en Colombia y Ecuador para los cultivos de mora y lulo, con el objetivo de conocer el diagnóstico situacional de los mismos. Esto permitió al final del proyecto comparar los impactos generados por las nuevas tecnologías. (Anexo 5: *Línea base de la mora de castilla en Ecuador y* Anexo 6: *Línea base mora lulo en Colombia).*

2.3.5. ANÁLISIS ECONÓMICO PARA LOS CULTIVOS DE MORA Y LULO

2.3.5.1. Análisis económico del cultivo de naranjilla *(Solanum quitoense lam.)*

- ✓ **Análisis económico de alternativas de manejo integrado**

Se hizo con el objetivo de seleccionar con base al mejoramiento de la productividad y calidad de la fruta. Los resultados mostraron que con la introducción de las nuevas tecnologías se registró la mayor productividad en el T5: Injerto S. *arboreum* (variedad silvestre de la zona), que presentó resistencia a enfermedades como *Fusarium oxysporum* y nematodos del género *Meloidogyne incógnita.* Se registraron los mayores rendimientos, con un manejo rotativo en las aplicaciones para el control de lancha (*Phytophthora infestans)*, podas fitosanitarias y las aplicaciones rotativas de productos de baja toxicidad, para el control de perforador del fruto aplicando *Bacillus thurigensis*, y Abamectina cada 15 días, obteniendo así una productividad de 18010,0 Kilos por/ha.

Se determinó que el tratamiento T1 (*Solanum hirtum*,+ control completo) y T5 (*Solanum arboreum* + control completo) obtuvieron mayores beneficios netos y tasas de retorno marginal superiores al tratamiento T9 testigo del agricultor, en el que se emplearon varios productos altamente tóxicos y residuales para el control de plagas, lo que también es importante considerar, ya que afectan de manera importante la salud de productores y consumidores y deterioran la flora y fauna amazónicos. (*Anexo 7. Análisis Económico Cultivo de Naranjilla, Ecuador*).

- ✓ **Manejo de la nutrición del cultivo de naranjilla *(Solanum quitoense lam.)* en las zonas de producción de la región amazónica y noroccidente de Pichincha [41].**

Con este análisis, el cual toma únicamente los costos que varían en cada tratamiento, los cuales en esta investigación fueron: los insumos de campo y la mano de obra utilizados en este cultivo en función de rendimiento, se determinó que el tratamiento con el beneficio neto más elevado en las dos localidades fue el T8 : Completo + Encalado, con un beneficio neto de $16412,6 dólares en la (L1-Saloya) y $13786,4 dólares en la (L2-El Triunfo); el tratamiento con el beneficio neto más bajo en las dos localidades fue el T2: NKCaSMg, con un beneficio neto de $4053,6 dólares en la (L1) y $2295,1 dólares en la (L2), todo esto proyectado por hectárea; esta diferencia entre localidades se debe a que el rendimiento total en la (L1) fue 14 % más que en la (L2).

[41] Resumen de tesis previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.
Félix Bastidas[41], Franklin Valverde[41], Pablo Viteri[3], Juan León[3]

- ✓ **Evaluación agronómica y resistencia a nemátodos *(Meloidogyne incógnita)* y al hongo *(Fusarium oxysporum)* de dos variedades de naranjilla injertas en siete accesiones de la Sección Lasiocarpa noroccidente –pichincha[42].**

Se observa que la naranjilla común injerta en el patrón *Solanum hirtum* (t2), presenta el mejor beneficio económico neto. En el análisis constituido por 2500 plantas se obtuvo un beneficio neto de 78095,00 dólares. Seguido de naranjilla común injerta en el patrón *Solanum pectinatum* (t7) se obtuvo un benéfico neto de 69763,51dólares a pesar de que en este tratamiento las características agronómicas no fueron notorias.

Del análisis económico realizado, se concluye que la naranjilla Común injerta en patrones provenientes de semilla botánica, *Solanum pseudolulo* y *Solanum pectinatum* presentaron el mayor beneficio neto (505.5 y 409.7 dólares respectivamente) en tres meses de cosecha en una superficie de 24 m^2.

El beneficio económico neto de la naranjilla Común e híbrido Puyo, es de 34338,21y 16036,67 dólares respectivamente, esto se atribuye a que la mano de obra para injertación no es necesaria y el material (semillas) que se obtiene de uno a tres frutos es suficiente para una hectárea.

El análisis económico a través del presupuesto parcial basado en el método de Perrín publicado por el CIMMYT (2001), para un período de cosecha de tres meses se observa que la naranjilla Común injerta en el patrón *Solanum hirtum* (t2), presenta el mejor beneficio económico neto.

En el análisis por parcela experimental (constituida por 408 plantas) se obtuvo un beneficio neto de 505.48 dólares. Seguido de naranjilla Común injerta en el patrón *Solanum pectinatum* (t7) se obtuvo un beneficio neto de 409.66 dólares a pesar de que en este tratamiento las características agronómicas no fueron notorias.

Entre los testigos naranjilla Común e híbrido Puyo, el beneficio económico neto es de 370.08 y 99.62 dólares respectivamente, esto se atribuye a que la mano de obra para injertación no es necesaria y las semillas que se obtiene de uno a tres frutos es suficiente para una hectárea.

- ✓ **Evaluación de reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de naranjilla *(Solanum quitoense. híbrido puyo*). San Miguel de los bancos- pichincha[43].**

El tratamiento con mejor rendimiento fue el t16 (Maxigrow Excel + Citokin con tres aplicaciones y a dosis de 3,75ml/l y 1 ml/l respectivamente) con 0,870 kg/planta

[42] Amanda Chiluisa, Jenny Herrera, Wilson Vásquez, Pablo Viteri, Juan León
[43] J. Navarrete; P. Viteri; J. León; W. Vásquez.

(2,18 TM/ha por cosecha); mientras que el tratamiento con menor rendimiento fue el t19 (Testigo absoluto, sin aplicación) con 0,284 kg/planta (0,71 TM/ha por cosecha). El producto con mejor rendimiento fue el Maxigrow con 0,715 kg/planta (1,79 TM/ha por cosecha); el producto con menor rendimiento fue el Crezymax con 0,610 kg/planta (1,53 TM/ha por cosecha). **Análisis económico del cultivo de lulo *(Solanum quitoense lam.)* en Colombia**

Este análisis se hizo con el objetivo de evaluar el comportamiento, calidad y rentabilidad de los clones élite seleccionados, bajo diferentes sistemas de producción dirigida a diferentes mercados. Se compararon los costos de producción del sistema convencional de producción de lulo realizado por los productores con los costos de las nuevas tecnologías. Esta prueba se hizo utilizando opciones tecnológicas con diferentes materiales élite de lulo. Los costos de producción por Ha para la tecnología convencional fueron de $20.390375 millones de pesos y los ingresos de $49.036250 millones de pesos. Los costos de producción con las nuevas tecnologías fueron de $22.247275 millones de pesos y los ingresos de $72.112500 millones de pesos. Con esto se concluye que el productor con los materiales élite de lulo reduce el costo de producción por kilo de $520 pesos a $386 pesos por kilo. *(Anexo 8. Análisis económico cultivo de lulo en Colombia)*

2.3.5.2. Análisis económico del cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth)

RELACIÓN COSTO-BENEFICIO DEL MANEJO DE PRODUCCIÓN DE MATERIAL VEGETATIVO DE MORA CON PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

TRATAMIENTO	DOSIS g ó cc/Lt	No. APLIC.	COSTO/PRODUCTO $/g o cc	No.Jornales /m^2	COSTO TOTAL $	Rend. Plantas/ m^2	COSTO/ BENEFICIO
BIOLÓGICO	8	3	100	0.04	5750	28	0.20
QUIMICO	5	3	10.200	0.04	13.000	20	0.65

Costo total: costos fijos más variables
No plantas por m^2: 28
Rendimiento: una planta por estaca
Manejo químico: Hormonas y Tiabendazol
BIOLÓGICO: Mezcla de Trichoderma, Metarhizium, Beauveria y Paecilomyces

Costos por hectárea con una densidad de 1.111 plantas de Mora/Ha

RELACIÓN COSTO-BENEFICIO DEL MANEJO DE *Eurhizococcus colombiensis* con PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

PRODUCTO	DOSIS	No.APLIC./Año	COSTO/PRODUCTO $/Kg o Lt	No.Jornales/APLIC.	COSTO TOTAL AÑO $	Rend./ Ton/Ha/ año	COSTO/ BENEFICIO
Carbofuran GRANULADO	10 g/planta	4	11.000	6	975.000	7	1.11
Clorpirifos + Adherente	5 cc – 1cc	6	32.000 30.000	5	984.000 60.000	7	1.10
Biológico	0.18 g	6	80.000	7	960.000	11	1.74

El agricultor utiliza Carbofuran o Clorpirifos, el rendimiento por Ha es de 7 Ton por Ha con Control Químico y con biológico es de 11 Ton por Ha.

Los costos de producción por hectárea para el cultivo de la mora son de $19.130.050 millones de pesos y los ingresos de $ 21.750.000 millones de pesos con la tecnología tradicional, con ganancias de $2,619.950 por Ha. Con la tecnología desarrollada en el proyecto los costos de producción fueron de $18,710050 y los ingresos de $24,500.000, teniendo ganancias de $5,789.950. Anexo 9. (*Análisis Económico Cultivo de Mora, Colombia y* Anexo 10. *Tecnología Cultivo de Mora, Colombia*).

3. ANÁLISIS PROSPECTIVO

Los resultados obtenidos con el desarrollo del proyecto generaron impactos a nivel local, subregional y regional. En Colombia y Ecuador, se logró evaluar y caracterizar el recurso genético de mora y lulo existente en los bancos de germoplasma y en los campos de agricultores. Esto permitió seleccionar materiales con características élite de acuerdo a los parámetros del mercado, así como por su resistencia a plagas y enfermedades. Se validaron nuevas tecnologías de manejo limpio y esquema de multiplicación masivo de material de siembra, que contribuyeron al incremento de la producción de los cultivos y mejoramiento de la competitividad y la seguridad alimentaria de los agricultores.

De esta forma se caracterizaron 71 accesiones de mora y 43 de lulo en Colombia, así como 108 accesiones de mora y 100 híbridos interespecíficos de lulo en Ecuador. Se realizó la caracterización molecular de 36 materiales de lulo colectados en Colombia y 51 accesiones en Ecuador. En ambos países se encontraron materiales con características superiores a las comerciales; en mora se destacaron 14 accesiones en Ecuador y 9 en Colombia. Del germoplasma de lulo; se seleccionaron 9 materiales en Colombia con potencial para programas de mejoramiento o producción comercial y 9 materiales en Ecuador provenientes de cruzamientos interespecíficos.

Los resultados del análisis de la diversidad genética de la mora corroboran la reducida base genética de *R. glaucus*, detectándose sin embargo, la existencia de

una estructura genética entre el material cultivado con la conformación robusta de dos grupos de accesiones, uno de los cuales está formado únicamente por materiales ecuatorianos, mientras que el segundo, incluye a tres accesiones colombianas y a las variedades sin espinas recientemente promocionadas. Este resultado es importante en materia de mejoramiento genético de la mora. A corto plazo será importante disponer de la información morfoagronómica de los materiales y de realizar análisis moleculares complementarios que permitan determinar el origen de esta divergencia genética.

Se realizó la caracterización molecular de 36 materiales de lulo colectados en Colombia y 51 accesiones colectadas en Ecuador. Así mismo, se caracterizaron 39 materiales de lulo (25 tipo castilla, nueve provenientes de selecciones individuales de materiales segregantes de lulo la Selva y cinco híbridos interespecíficos); en tres áreas de interés para productores, comercializadores y transformadores. La respuesta diferencial de estos materiales de lulo frente a problemas fitosanitarios propios de zonas productoras con alta nubosidad, alta humedad relativa y alta precipitación, permite que los materiales de mejor comportamiento frente a estas condiciones, puedan ser elegidos por los agricultores para comercialización y otros materiales sean seleccionados por programas de mejoramiento para generar variedades con mejores características de resistencia a enfermedades y calidad de fruta.

La determinación de características físico químicas y sensoriales en lulo permitió identificar clones con caracteres deseados para la agroindustria como son grados brix, aroma, sabor, color de la pulpa y conversión de fruto a pulpa, lo cual permitiría acceder a nuevos mercados nacionales e internacionales que demandan altos estándares de calidad en estos aspectos. De igual manera la identificación de materiales con color del fruto, lenta senescencia, resistencia al manipuleo, acidez y pulpas verdes posicionarían mejor el mercado en fresco de esta fruta.

Se observaron diferencias entre materiales frente a características específicas, de resistencia a enfermedades, producción o calidad de fruta. Tres clones (PL9, PL24 y PL11) mostraron resistencia alta tanto a *Colletotrichum* spp., como a *Phytophthora infestans*. Por otro lado con la información colectada se determinó, que el ciclo productivo del lulo en las dos condiciones evaluadas está entre los 16 a 20 meses, no obstante existen materiales como los PL que en condiciones de Santa Rosa de Cabal (Colombia) que siguen en un buen nivel de producción luego de los 20 meses de siembra.

En este sentido, la metodología desarrollada y la diversidad de materiales existente en campo, son una herramienta clave para el futuro proceso de mejoramiento, ya que se identificaron materiales que cuentan con características de interés superiores a las referencias comerciales, tanto para mercados de fruta fresca como procesados. Estos resultados incrementan el conocimiento sobre el acervo genético de la especie de *Solanum* sp para Colombia y Ecuador.

Por otro lado, se liberó la variedad de Naranjilla de jugo **INIAP—Quitoense 2009**, tolerante a nemátodos y *Fusarium*. Esta variedad representa una verdadera innovación tecnológica al ser la primera variedad de naranjilla que se comercializa injertada sobre patrones con tolerancia a enfermedades y plagas. Esta tolerancia permite reducir el uso de pesticidas, mejorar la salud de los productores, consumidores y del suelo.

En el cultivo de mora de castilla, se logró solucionar tres problemas específicos que son la producción masiva de plántulas de mora; control de la perla de la tierra e identificación del modo reproductivo. El sistema de producción de estacas enraizadas con Trichoderma permitió obtener buenas cantidades de plántulas libres de plagas y enfermedades, este sistema se implementó con la asociación de agricultores ASOFAMORA de Ginebra Valle del Cauca (Colombia). Esta metodología tiene como ventajas con relación a la que usan los agricultores de la zona: producir plantas sanas (libres de plagas y enfermedades) y evitar la propagación de la perla de tierra (*Eurhizoccocus* colombianus) principal plaga de la zona y causa del abandono de los cultivos. Por otro lado, se encontró que las cepas de *M. anisopliae* aislado de adultos y ninfas de *E. colombianus* resultó ser el más patogénico. Por lo tanto se convierte en una alternativa de manejo limpio ya que el único control disponible era el químico, pero inefectivo por la presencia de la cera que recubre los estadíos ninfales adheridos a la raíz y la profundidad a la cual se encuentra la plaga (10-30 cm).

Se identificó el modo reproductivo de ocho ecotipos de mora de castilla pertenecientes a la colección de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. La apomixis facultativa con tendencia a la sexualidad fue encontrada en todos los ecotipos. Este es el primer reporte de apomixis en las moras de castilla Colombianas y deber ser tenido en cuenta para iniciar programas de mejoramiento genético ya que las ventajas que ofrece la apomixis facultativa son muchas. Se destacan la fijación inmediata de caracteres deseables en genotipos superiores, no se necesita control riguroso de la polinización y permite la clonación de híbridos superiores. Esto se traduce en reducción de costos de producción de cultivares, reducción mínima del aislamiento físico para conservar líneas homocigotas y para los agricultores principalmente de países en desarrollo permite sostener altos rendimientos por tiempo indefinido, usando parte de las semillas cosechadas sin pérdidas en la producción debidas a la segregación.

Con la caracterización molecular de patógenos como *Colletotrichum sp.*; se contribuye a una mayor comprensión de la enfermedad, proporcionando herramientas útiles para posteriores estudios relacionados con el diseño de alternativas tecnológicas para el manejo integrado de la antracnosis en mora. De esta forma se contribuye significativamente a mejorar el estado fitosanitario del cultivo. Las poblaciones colombianas de *Colletotrichum* spp.; agente causante de la antracnosis en mora de castilla, están conformadas en su mayoría por las especies *C. gloeosporioides* y *C.acutatum* y en un grado no significativo por la especie *C. boninense.* Los aislamientos identificados como *C. gloeosporioides* presentan niveles de patogenicidad alta, intermedia y baja; mientras que los de la

especie *C. acutatum* tienden a presentar niveles de patogenicidad baja a muy baja. La identificación preliminar de cinco genotipos de *Rubus* spp.; como resistentes a la antracnosis, constituye un paso importante en la identificación a futuro de posibles genes de resistencia a esta enfermedad, los cuales podrían ser incorporados en un programa de mejoramiento genético de *Rubus glaucus.*

En cuanto a la evaluación de alternativas de control biológico de *Colletotrichum*, se encontró que todas las cepas de *Trichoderma* spp.; evaluadas mostraron inhibición del crecimiento de los patógenos, en los ensayos *In Vitro, Tagetes patula* fue el extracto vegetal que mostró mayor inhibición (100%) del crecimiento de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *B. cinerea*, seguido de Ecoswing® (extracto de swinglea). Esto proporciona una alternativa en miras de minimizar el uso de agroquímicos perjudiciales. Los tratamientos evaluados, tanto biocontroladores como extractos vegetales, proporcionan una alternativa para el manejo y control de los patógenos, mostrando una alta especificidad, hacia algunos microorganismos, lo que puede ser la base para incrementar y mejorar el manejo de las enfermedadades.

Los resultados presentados aquí constituyen una fuente importante de información para la toma de decisiones, acerca del manejo y control de la antracnosis de la mora de Castilla en zonas productoras de Colombia y como modelo para trabajar en otros frutales.

En Ecuador se identificó molecular y genéticamente las especies de *Colletotrichum sp.*, en naranjilla (*Solanum quitoense),* encontrándose que el 90% de los aislamientos evaluados pertenecen a la especie *C. acutatum.*, y un 10% a la especie *C. gloeosporioides*. La especie *gloeosporioides* dentro del estudio tiene una incidencia del 20% en los cultivos de naranjilla en las diferentes zonas del Ecuador.

De acuerdo al índice de incremento del nemátodo *Meloidogyne incognita*, se concluye que la naranjilla común injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum*, presentaron los índices más bajos de incremento de la población de nematodos siendo calificados como resistentes tolerantes al ataque. Sin embargo la naranjilla Común injerta en *S. hispidum* es considerado tolerante, por no haber sido afectado el rendimiento.

La alta incidencia de *Fusarium oxysporum*, en la naranjilla común e híbrido Puyo (100 y 83.3% respectivamente) se les puede calificar como variedades susceptibles lo que afectó el rendimiento y calidad del fruto. De los resultados obtenidos a nivel de invernadero, el híbrido Puyo injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum* presentaron el 100% de afinidad; mientras que la naranjilla común injerta en *Solanum pectinatum* presentó una afinidad de 98.75%, en otra palabras, la injertación entre las dos especies vegetales presentaron soldadura consistente.

Los patrones producidos de semilla fueron los que presentaron mejores características de afinidad con respecto a los patrones producidos por estaca. La naranjilla Común injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum* presentaron el mejor comportamiento agronómico y el mayor grado de compatibilidad, pues su vigor y rendimiento fue superior a los otros tratamientos, con 15679.6 y 19710 kg/ha en tres meses de cosecha.

De acuerdo al índice de incremento del nematodo *Meloidogyne incognita*, se concluye que la naranjilla Común injerta en *Solanum pseudolulo* y *Solanum hirtum*, presentaron los índices más bajos de incremento de la población de nematodos (0.33 y 0.37 veces) siendo calificados como resistentes tolerantes al ataque. Mientras que para el resto de tratamientos el índice de incremento de la población de nematodos fueron altos y variados con rendimientos bajos por lo que fueron calificados como susceptibles no tolerantes y resistentes no tolerantes. Sin embargo la naranjilla Común injerta en *S. hispidum* es considerado tolerante, por no haber sido afectado el rendimiento.

Con estos resultados se recomienda utilizar plantas de naranjilla injertas en patrones producidos por semilla *Solanum pseudolulo*, *Solanum hirtum* y *Solanum pectinatum*, por las mejores características agronómicas, afinidad, compatibilidad, y por la resistencia demostrada frente al ataque de *Fusarium oxysporum* y *Meloidogyne incognita*.

Se identificaron como enemigos naturales del "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*), los hongos *Beauveria* sp*., Aspergillus* sp., y *Verticillium* sp, las bacterias *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa*, dos virus de ADN de simple cadena circular y el parasitoide *Copidosoma* sp. (Encyrtidae, Encyrtinae). Los hongos *Beauveria* sp., *Aspergillus* sp., y *Verticillium* sp., mostraron un porcentaje de infección natural al estado larval de 0.68 %; siendo *Beauveria* sp., al que se lo podría considerar promisorio por sus características para usarlo como biocontrolador. Las bacterias *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa* presentaron un porcentaje de infección al estado larval de 0.79 %, siendo *B. cereus* la más común y la que mostró características alentadoras para su posible uso como organismo de control biológico.

Los enemigos naturales que exhibieron el valor más alto de ataque a larvas del "Barrenador del fruto" (*Neoleucinodes elegantalis*) fueron los virus, con un 7.47 % de infección natural. Los parasitoides constituyen la única medida de control biológico que se pudiese aplicar para el control de pupas de *N. elegantalis*, teniendo en cuenta que su presencia está muy relacionada con el tipo de manejo del cultivo. El parasitoide ovo – larval *Copidosoma* sp*.,* mostró un porcentaje de ataque de 1.36 %; podría ser un enemigo natural con amplias posibilidades de control de *N. elegantalis.*

El crecimiento proyectado de la demanda industrial de lulo, y el surgimiento de híbridos interespecíficos para el consumo en fresco, pronostican una demanda alta de material de siembra propagado clonalmente. La oferta de material de

siembra actual es reducida, indicando que la viabilidad del laboratorio aquí fortalecido puede estar asegurada. Obviamente, muchos factores fuera del control de los investigadores influyen en la viabilidad comercial de este negocio. No obstante, con la tecnología actual implementada en el proyecto se da inicio a una actividad que tiene el potencial para crecer en el futuro cercano.

Se desarrollaron sistemas de propagación *in vitro* de lulo a bajo costo, implementando un laboratorio de propagación de materiales con la organización de productores ASLUBEL, en el municipio de Belén de Umbría, departamento de Risaralda (Colombia). Se consiguió el apalancamiento con otras instituciones para continuar con el trabajo. Este resultado se ha producido como co-financiación de los proyectos aprobados por el Ministerio de Agricultura de Colombia y con el cual se estableció dinamismo y sinergia con el proyecto financiado por Fontagro. Con esta estrategia se logró disminuir los costos de inversión en equipos equivalente a 83%, pasando de $25.850.000 (millones de pesos) a $4.350.000 (millones de pesos).

Cabe resaltar que el proyecto se implementó a través de alianzas estratégicas entre centros avanzados de investigación agrícola internacional y nacional de Colombia y Ecuador; Universidades y asociaciones de productores. Este esquema operativo usado ofrece no sólo soluciones tecnológicas sino también el establecimiento y consolidación de sistemas de innovación agroindustrial funcionales que contribuyen a la sostenibilidad de los procesos de innovación promovidos e iniciados durante la ejecución del proyecto.

Con el objetivo de continuar fortaleciendo los resultados obtenidos en el proyecto se recomienda:

- Continuar con la caracterización de otros materiales de mora y lulo comerciales y silvestres existentes en Colombia y Ecuador, en aspectos fitosanitarios, calidad y rendimiento de la fruta y arquitectura de la planta.
- Realizar pruebas de comportamiento de los materiales bajo condiciones ambientales de cada una de las zonas productoras de ambos países.
- Desarrollar nuevas pruebas de biocontrol para los principales problemas fitosanitarios que afectan el cultivo de lulo en cada una de las zonas productoras de ambos países.
- Iniciar la selección de materiales de lulo con características requeridas para ser utilizados como patrones y de igual manera seleccionar copas con caracteres de interés para mercado agroindustrial y fresco.
- Iniciar trabajos de resistencia varietal en materiales comerciales y silvestres con relación a las principales plagas y enfermedades de lulo.

4. PUBLICACIONES Y OTROS PRODUCTOS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Arenas, A., Álvarez, E., Afanador, L., Mejía J.F., González, A. 2007. Especies de *Colletotrichum* asociadas con la antracnosis de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en el Valle del Cauca. Fitopatología Colombiana 31(1):7-14.

Arenas, A., Álvarez, E., González, e., Mejía, J.F. 2007. Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. Asociados a la antracnosis de cultivos de mora del Valle del Cauca. Memorias XXVIII Congreso de la Asociación colombiana de Fitopatología y ciencias afines ASCOLFI. 073.

Arango, L.M., Álvarez, E., Llano, G.A., González, A., Torres, C. 2009. Evaluación de alternativas de control in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea* mediante el uso de *Trichoderma* spp. y extractos Vegetales. Memorias XXIX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatologia y Ciencias Afines ASCOLFI 132.

Afanador K, Lucía., Álvarez Elizabeth y González Alonso. 2009. Patogenicidad de especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de la mora de castilla en Colombia e identificación preliminar de fuentes de resistencia en germoplasma de *Rubus spp.* Artículo científico en Memorias XXIX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI 132

Afanador, L., Álvarez, E. González, A. Mejía J.F. 2009. Especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Colombia. Memorias XXIX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatologia y ciencias afines ASCOLFI 115.

Muñoz, L.A., González, A., Álvarez E., Llano Germán, Buitrago, M. E., *et al*. 2010. Lulo con valor agregado: alternativas para el pequeño agricultor. *In* Ciencia y Tecnología para la competitividad del Sector Agropecuario 2002-2010. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Dirección de Desarrollo Tecnológico y Protección Sanitaria. Colombia. P 110-111.

Montes, C., Muñoz, L.A., Terán, V.F., Prado, F.A. y Quiñonez, M.A. 2010. Evaluación de patógenos en clones de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *In* Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Vol 59(2) Abril-Junio 2010. P144-154.

ARTICULOS POR PUBLICAR

Lobo Mario, Clara Inés Medina, Juan Diego Murillo. 2010. Caracterización y evaluación morfológica y química de la colección de mora. CORPOICA CI La Selva. Colombia

Acevedo Bernal, Natalia. 2010. Evaluación in-vitro del efecto de canela (*Cinnamomum zeylanicum* nees), para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* penz. & sacc.) en el cultivo de mora (Rubus glaucus benth)". Universidad Santa Rosa de Cabal. Colombia.

Romero Díaz, Leidy Milena y Valencia Carvajal Juan Pablo. 2010. Evaluación del efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis (*Colletotrichum spp*) en el cultivo de lulo la selva (Solanum quitoense x Solanum hirtum). Universidad Santa Rosa de Cabal. Colombia.

Marmolejo Cortes, Diego Fernando; Vásquez Amariles, Herney Darío; Muñoz Jaime Eduardo. 2010. Tratamientos de escarificación de semillas de mora. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. Palmira, Colombia.

Marmolejo Cortes, Diego Fernando; Vásquez Amariles, Herney Darío; Muñoz Jaime Eduardo. 2010. Variabilidad genética en medios hermanos de ecotipos de mora de castilla. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. Palmira, Colombia. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. Palmira, Colombia.

TESIS DE GRADO

Arango, Lina. 2009. Evaluación de alternativas de control in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides, Colletotrichum acutatum* y Botrytis cinerea mediante el uso de *Trichoderma* spp., y extractos Vegetales. Tesis de grado. Universidad del Valle. Cali, Colombia. 101p. *Anexo 11.*

Arenas, Adriana. 2007. Caracterización molecular y patogénica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de mora en el Valle del Cauca. Tesis de grado. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. Cali, Colombia. 89p. *Anexo 12.*

Afanador Kafuri, Lucía. 2010. Antracnosis de la mora de la castilla (*Rubus glaucus* BENTH) identificación de fuentes de resistencia y variabilidad en especies y razas del patógeno. Tesis de PhD. Universidad Nacional sede Medellín.

Muñoz, Luis Armando. 2010. Evaluación agronómica de materiales de lulo *Solanum sp*, frutal de alto potencial para zonas tropicales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira. Palmira, Colombia. 73p. *Anexo 13.*

Parra Giraldo, Pedro Pablo. 2010. Metodología *in vitro* para la evaluación de germoplasma de lulo *Solanum spp.* bajo la presión de toxinas de *Colletothrichum acutatum*. Tesis de grado Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

González Valencia, Diana Milena. 2010. Respuesta diferencial a la incidencia de los principales problemas fitosanitarios en 24 materiales de lulo. Tesis de grado.

Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 91p.

Agudelo, Diana Carolina. 2010 Marín Evaluacion de variables de rendimiento y calidad en 24 materiales de lulo Solanum spp en el departamento de Risaralda. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 82p.

Franco Arias, Andrés Leonardo. Respuesta diferencial a la incidencia y severidad y/o de infestación de 15 materiales de lulo Solanum quitoense Lam. en el departamento de Risaralda. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 75p.

Santacoloma Múnera, Cristian David. 2010. Evaluacion de variables de rendimiento y calidad en 39 materiales de lulo Solanum quitoense Lam en el departamento de Risaralda. Tesis de grado Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 74p.

Valencia, Adrian Mauricio. Descripción morfológica y determinación de tiempos fenológicos, cualificación del vigor en 24 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam. en el departamento de Risaralda. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 79p.

Acevedo Bernal, Natalia. 2008. Evaluación in-vitro del efecto de canela (*Cinnamomum zeylanicum nees*), para el control de antracnosis (Colletotrichum gloeosporoides (penz) penz. & sacc.) en el cultivo de mora (Rubus glaucus benth)". Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 87p.

Romero Díaz, Leidy Milena y Valencia Carvajal, Juan Pablo. 2009. Evaluacion del efecto de metabolitos intermedios a partir de extractos vegetales sobre antracnosis (*Colletotrichum spp*) en el cultivo de lulo la selva (*Solanum quitoense x Solanum hirtum)*. Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 89p.

Alzate Ocampo, Nicolás; Flórez Mejía, Jefferson y Vaca, José Vicente. 2010. Evaluación del contenido de materia seca y nutrientes en cada etapa de desarrollo de lulo hibrido la selva clon p 32 S*olanum quitoense* Lam *x Solanum hirtum* en el municipio de Santa Rosa de Cabal, Risaralda. Tesis de grado. Ingeniero

Agrónomo. Universidad de Santa Rosa de Cabal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. 68p.

Marmolejo Cortés, Diego Fernando. 2011. Evaluación de apomixis en germoplasma mejorado de mora de castilla. Tesis MSc. Facultad de Ciencias Agrarias, énfasis Fitomejoramiento. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Palmira, Colombia. 83 p.

Murillo, Juan Diego. 2009. Caracterización química y morfológica del banco de germoplasma de *Rubus sp.* del C.I "La Selva" de Corpoica. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. Colombia. 95p.

Zapata, Pedro A. 2010. Establecimiento de un protocolo para la multiplicación vegetativa de plántulas inoculadas con hongos biocontroladores como valor agregado y como estrategia preventiva para el manejo integrado de plagas y enfermedades en campo. Trabajo de la especialización en Frutales Tropicales. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Palmira, Colombia.

Ayala, Félix Germán; Jácome Rosendo y Vásquez Wilson. 2008. Actualización y complementación de la línea base de la mora, establecimiento de un sistema de seguimiento y evaluación participativo. Ecuador.

Chiluisa, Amanda y Herrera, Jenny 2008. Evaluación agronómica y resistencia a nemátodos *(Meloidogyne incognit*a) y al hongo *(Fusarium oxysporum)* de dos variedades de naranjilla injertas en siete accesiones de la sección Lasio-carpa noroccidente – Pichincha. Tesis de pregrado. Ingeniera Agrónoma. Universidad Técnica de Cotopaxi. Facultad de Agronomía. Ecuador.

Gómez Vaca, Ángel Paúl. 2009. Caracterización Agro-Morfológica de clones y segregantes de 39 cruzamientos interespecíficos de naranjilla para identificar materiales promisorios con características de resistencia y/o tolerancia a plagas y enfermedades, alta productividad y buena calidad del fruto. San Francisco- La Cecilia-Pichincha. Tesis de pregrado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agrarias Recursos Naturales y del Ambiente. Bolívar, Ecuador.

Guitarra, Diego. 2008. Evaluación y selección de reguladores de crecimiento que influyan en el tamaño del fruto de naranjilla híbrido puyo, que tenga baja residualidad, y que puedan reemplazar al 2-4D. Tesis de pregrado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador.

Sosa Sosa, María Cristina. 2009. Prospección de enemigos naturales del barrenador del fruto (*Neoleucinodes elegantalis* (Guenés)) de la naranjilla (*Solanum quitoense*) y evaluación de la incidencia de las plagas en su cultivo.

Tesis de pregrado. Ingeniera Agrónoma. Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito Ecuador.

López, Priscila 2010. Determinación de las características fisicoquímicas y estudios de los índices de calidad en el comportamiento postcosecha de los materiales seleccionados en clones élite provenientes de cruzamientos de naranjilla. Tesis de pregrado. Ingeniera Agroindustrial. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y ambientales (FICAYA). Ibarra. Ecuador.

Bastidas, Félix y Valverde, Franklin. 2010. Manejo de la nutrición del cultivo de naranjilla *(Solanum quitoense lam.)* en las zonas de producción de la región amazónica y noroccidente de Pichincha. Tesis de pregrado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agrarias Recursos Naturales y del Ambiente. Bolívar, Ecuador.

Navarrete, José Luis. 2010. Evaluación de reguladores orgánicos de crecimiento para el engrose del fruto de naranjilla *(Solanum quitoense. híbrido puyo*). San Miguel de los Bancos-Pichincha. Tesis de pregrado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito Ecuador.

Viteri Nolivos, Evelyn Andrea. 2010. Evaluación de sustratos en el desarrollo de *Neoleucinodes elegantalis* (G). Tumbaco, Pichincha. Tesis de pregrado. Ingeniera Agrónoma. Universidad Central de Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito, Ecuador.

Cárdenas, Diego. 2010. Identificación molecular y caracterización genética y patológica de *Colletotrichum* sp. aislados de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam) Tomate de árbol (*Solanum bateceum*) y Chirimoya (*Annona cherimola* Mill) provenientes de zonas productoras del Ecuador. Tesis de pregrado. Ciudad. Ecuador.

Garrido Haro, Patricia de los Ángeles. 2009. Análisis de la diversidad genética de la mora cultivada (*Rubus glaucus* benth) y especies emparentadas en zonas productivas del Ecuador mediante marcadores moleculares. Tesis de pregrado.

Manangón, Lucía. 2010. Patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f.sp. *quitoense* en la sección Lasiocarpa. Tesis de pregrado. Ingeniera Agropecuaria. Instituto Agropecuario Superior Andino. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ciudad. Ecuador.

Calderon, Rodrigo. 2010. Caracterizacion agromorfológica y selección de naranjilla (*Solanum quitoense Lam.)* con resistencia y/o tolerancia a *Fusaium oxysporum y Meloidogyne incognita*, con buen rendimiento y calidad en el Noroccidente de Pichincha. Tesis de pregrado. Ecuador.

Cajamarca, Marco Vinicio. 2010. Validación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de plagas en el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense Lam.*) en el Cantón Archidona, Provincia del Napo. Tesis de pregrado. Ecuador.

Viteri, Pablo. Injertación de naranjilla en solanáceas silvestres, una alternativa para el manejo de Fusarium y nematodos. Tesis de maestría. Ecuador.

Brito, Beatriz y Montalvo, Daniela. 2010. Determinación de las características fisicoquímicas y estudio de los índices de calidad en el comportamiento postcosecha de los materiales seleccionados en clones élite provenientes de cruzamientos de naranjilla en el Ecuador. Tesis de pregrado. Ecuador.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN EN PROCESO DE FINALIZACIÓN

Perenguez, Eduard. 2010. Reconocimiento y evaluación de Enemigos naturales asociados a *Eurizococcus colombianus* en tres departamentos. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Tesis de pregrado. Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia-sede Palmira. Palmira, Colombia.

Botero, Carlos Felipe. 2010. Descripción morfológica y determinación de tiempos fenológicos, cualificación del vigor en 15 materiales de lulo *Solanum quitoense* Lam. en el departamento de Risaralda. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. (Trabajo en proceso).

Zuleta Barco, Carolina. 2010. Descripción morfológica y determinación de tiempos fenológicos en 42 materiales de lulo Solanum sp en el departamento de Risaralda. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. (Trabajo en proceso de publicación).

Zuleta Ospina, Jesús. 2010. Caracterización morfoagronómica de germoplasma de lulo *Solanum quitoense Lam y Solanum quitoense x Solanum hirtum* y evaluación de la resistencia al pasador del fruto *Neoleucinodes elegantalis* Guenée. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Agronomía. Santa Rosa de Cabal, Risaralda, Colombia. (Trabajo en proceso).

MANUALES-CARTILLAS-PÓSTER

Revelo M., Jorge; Viteri D., Pablo; Vásquez C., Wilson; Valverde, Franklin M.; León, Juan F.; Gallegos, Patricio. 2010. Manual del cultivo ecológico de la naranjilla. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Quito, EC. 120 p. (Manual Técnico No.77) (SB 379 .N3 .R3).

Garrido P[1]., Vásquez W[2]. y Morillo E[1] [1] INIAP. Departamento Nacional de Biotecnología. EESC, Quito, Pichincha, Ecuador. Programa Nacional de Fruticultura. Granja Experimental. Tumbaco, Pichincha Ecuador. Análisis de la

diversidad genética de la mora cultivada (*Rubus glaucus* benth) y especies emparentadas en zonas productivas del ecuador mediante marcadores moleculares.

INIAP. 2009. Boletín divulgativo No. 354. **INIAP QUITOENSE-2009.** Naranjilla de jugo (S*olanum quitoense* Lam.) injerta en patrones de solanáceas silvestres resistentes a *Fusarium oxysporum* y a *Meloidogyne incognita.* Pablo Viteri Díaz, Wilson Vásquez, Juan León F, William Viera, Manuel Posso M, Milton Hinojosa A, Jorge Revelo, Jose Ochoa. Programa Nacional de Fruticultura Granja Experimental Tumbaco. Estación experimental Santa Catalina. Junio 2009. Quito Ecuador.

Parra, Pedro Pablo; Muñoz Luis Armando; Buitrago Maria Eugenia; Alvarez Elizabeth y González Alonso. 2010. Póster metodología *in vitro* para la evaluación de germoplasma de lulo *Solanum sp.,* bajo la presión de toxinas de *Colletothrichum acutatum.*

Perenguez, Eduard. 2010. Póster "Reconocimiento y evaluación de Enemigos naturales asociados a *Eurizococcus colombianus* en tres departamentos". Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Póster *in* el congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEM), realizado en la Universidad Javeriana del 31 de Julio a Agosto 2 de 2010. Bogotá, Colombia.

Rodríguez, F. 2010. Manual: Estrategia de competitividad de la cadena de la mora. Grupo GIAR y CIAT.

5. EJECUCIÓN DEL PRESUPUESTO

Se anexa la ejecución presupuestaria

6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a FONTAGRO por el apoyo económico y el programa de frutales tropicales del CIAT, los integrantes laboratorio de Biología Molecular y el personal del Laboratorio Bioecológicos, Palmira.