



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE  
LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:** IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE  
HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA DEL  
DURAZNO (*Prunus persica*) DE LA VARIEDAD “DIAMANTE” EN LA  
PROVINCIA DE PICHINCHA.

**AUTOR:** ABATA QUINCHUQUI LIZETH KATHERINE

**DIRECTOR:** FLORES FRANCISCO, PhD.

**SANGOLQUÍ**

**2016**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA DEL DURAZNO (*Prunus persica*) DE LA VARIEDAD “DIAMANTE” EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA” realizado por LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 17 Junio 2016

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Francisco Flores', escrita sobre una línea punteada.

FRANCISCO FLORES

**DIRECTOR**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

### AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI**, con cedula de identidad N° 172149454-8 declaro que este trabajo de titulación **“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA DEL DURAZNO (*Prunus persica*) DE LA VARIEDAD “DIAMANTE” EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

**Sangolquí , 17 de Junio 2016**

.....  
LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI

C.C 172149454-8



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, “**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSTCOSECHA DEL DURAZNO (*Prunus persica*) DE LA VARIEDAD “DIAMANTE” EN LA PROVINCIA DE PICHINCHA**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

**Sangolquí, 17 de Junio 2016**

.....  
**LIZETH KATHERINE ABATA QUINCHUQUI**

C.C 172149454-8

## **DEDICATORIA**

A Dios por la vida.

A mi familia que ha sido mi motor.

A mi novio por su amor incondicional.

A mis amigos por todo su apoyo.

*Lizeth Katherine Abata Quinchuqui*

## AGRADEMIENTO

Doy gracias a mi Dios del cielo por protegerme siempre, y nunca dejarme sola. A mi padre Juan Abata quien con esfuerzo y dedicación luchó incansablemente para ver a sus hijos superarse. A mi hermosa madre Lidia Quinchuqui mujer trabajadora e inquebrantable, quien con su amor siempre me impulsó a seguir adelante, ella es mi inspiración y mi modelo a seguir. Ambos han sido pilar fundamental de mi vida, y sé que sin ellos no hubiese alcanzado mis metas. A mis hermanos Cristian y Michelle por su cariño y apoyo incondicional, quienes, con sus palabras, y juegos llenaban mi vida de alegría.

A mis amigos de casi toda mi juventud y espero de mi vida Patricia, Dayana, Gustavo, Ricardo, David, José, Inti y Samuel por ser parte fundamental de mi vida, por permanecer conmigo, darme palabras de aliento y brindarme tantos años de amistad.

A mis amigos de la universidad Pao, Mayrita, Giovi, Diego, Andre, Marquito, Salo, Polit, Eve con quienes compartí hermosas experiencias que siempre llevaré en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio Alejo, Gabo, Giovi, Sebas, Renato, Jani a quienes llegue a conocer y apreciar, que con sus juegos y risas me enseñaron la importancia del compañerismo, y del apoyo mutuo. A los pasantes Sofy, Helen, Byran, Kirsty y Stefy quienes con buena voluntad y muchas ganas pusieron su granito de arena para llevar a cabo este proyecto.

A mi director de proyecto de titulación el Dr. Francisco Flores por el apoyo, compromiso, y por la confianza depositada en este proyecto, pero sobre todo por ser el gran ser humano que ha sido conmigo. A la Master Alma Koch por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología del cual es responsable.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y al Ing. Viera William por su compromiso con el proyecto, y por brindarme las facilidades para terminar el mismo.

Y también a una persona muy especial que ha estado en mi vida ya por casi 7 años, hombre valiente que siempre se ha enfrentado en la vida con una sonrisa. Livingston Miranda más que mi novio ha sido el mejor amigo que eh podido tener. Su apoyo incondicional y cariño me han permitido seguir adelante en cada momento difícil de mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	<b>..ii</b>
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD</b> .....	<b>iii</b>
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTADO DE ANEXOS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Formulación del Problema .....	1
1.2 Justificación del Problema .....	1
1.3 Objetivos de la investigación .....	2
1.3.1 Objetivo general .....	2
1.3.2 Objetivos específicos .....	2
1.4 Marco Teórico .....	2
1.4.1 Generalidades del Durazno ( <i>Prunus persica</i> ) .....	2
1.4.2 Taxonomía de Durazno.....	3
1.4.4 Variedades .....	4
1.4.4.1 Variedad Diamante.....	4
1.4.4.2 Condiciones de cultivo de durazno var. Diamante .....	5
1.4.5 Producción de durazno a nivel mundial .....	5
1.4.6 Producción nacional de durazno .....	6
1.4.7 Hongos fitopatógenos.....	6

1.4.7.1	Morfología de hongos filamentosos.....	6
1.4.7.3	Síntomas de enfermedades causadas por hongos .....	8
1.4.7.4	Enfermedades fúngicas del durazno.....	8
a.	Podredumbre morena.....	8
b.	Torque o rulo .....	9
c.	Viruela de la Púa.....	9
d.	Podredumbre blanda .....	10
e.	Tiro de munición .....	10
f.	Pudrición Parda.....	11
g.	Mildiu polvoso.....	11
h.	Gomosis.....	12
1.5	Hipótesis .....	12
<b>2 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>		<b>13</b>
2.1	Muestreo .....	13
2.2	Aislamiento de hongos que afectan al durazno (var. Diamante).....	13
2.3	Postulados de Koch: pruebas de patogenicidad .....	14
2.4	Identificación morfológica de hongos aislados .....	15
2.5	Identificación molecular de hongos aislados.....	15
2.5.1	Extracción de ADN .....	15
2.5.3	Amplificación de región ITS, EF1 $\alpha$ e IcolaS.....	16
2.5.4	Electroforesis .....	18
2.5.5	Búsqueda de homólogos mediante BLAST.....	19
2.6	Almacenamiento de los aislados .....	19
<b>3 CAPÍTULO III: RESULTADOS.....</b>		<b>21</b>
3.1	Aislamiento de hongos fitopatógenos .....	21
3.2	Pruebas de patogenicidad: postulados de koch .....	23
3.3	Identificación morfológica de hongos fitopatógenos .....	24

3.4	Identificación molecular de hongos fitopatógenos .....	27
3.4.1	Extracción y cuantificación de ADN .....	27
3.4.2	Amplificación de los loci ITS, EF1 $\alpha$ e IcolaS .....	27
3.4.3	Ensamblaje de secuencias .....	29
3.4.4	Búsqueda de secuencias homólogas.....	29
3.5	Almacenamiento de aislamientos.....	30
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes para una reacción de PCR con volumen de 25uL, para la amplificación de ITS, EF1 $\alpha$ e IcolaS. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de electroforesis para los productos de PCR de ITS, EF1 $\alpha$ , e IcolaS.....	18
<b>Tabla 3.</b> Fecha de aislamiento y muestra sintomática de durazno a partir de la cual se obtuvieron aislados fúngicos de durazno con síntomas de pudrición .....	21
<b>Tabla 4.</b> Aislados identificados a nivel de género.....	24
<b>Tabla 5.</b> Aislado identificados a nivel de especie mediante búsqueda en la base de datos GenBank con el programa BLAST.....	30
<b>Tabla 6.</b> Códigos de cada aislado .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de hongos filamentosos .....	7
<b>Figura 2.</b> Reproducción asexual de hongos filamentosos .....	7
<b>Figura 3.</b> Fruto afectado por la podredumbre morena. ....	8
<b>Figura 4.</b> Hojas atacadas con síntomas de torque. ....	9
<b>Figura 5.</b> Hoja afectada por la viruela de la púa. ....	9
<b>Figura 6.</b> Fruto con síntomas de podredumbre blanda.....	10
<b>Figura 7.</b> Fruto y hoja con síntomas de tiro de munición. ....	10
<b>Figura 8.</b> Fruto con síntomas de pudrición parda.....	11
<b>Figura 9.</b> Fruto y hojas con síntomas de Mildiu polvoso.....	11
<b>Figura 10.</b> Muestra 8 presentando mancha café ubicada en el ápice. ....	13
<b>Figura 11.</b> Hongos sembrados en caldo papa dextrosa. ....	16
<b>Figura 12.</b> Crioconservación de aislados <b>A:</b> Aislados almacenados a largo plazo. <b>B:</b> Aislado A05 sembrado en PDB. ....	19
<b>Figura 13.</b> Almacenamiento a corto plazo. <b>A:</b> Aislados <b>B:</b> A08 sembrado en PDA. ....	20
<b>Figura 14.</b> <b>A:</b> Muestra P8 con presencia de hongo. <b>B:</b> Aislamiento A08 con 6 días de crecimiento en PDA obtenido de la muestra P8. ....	22
<b>Figura 15.</b> Muestra en cámara húmeda y aislamiento. <b>A:</b> Muestra P4 con presencia de hongo de color verde con bordes blancos. <b>B:</b> Aislamiento con 6 días de crecimiento en PDA obtenido de la muestra P4.....	22

<b>Figura 16.</b> Durazno sano inoculado con A14 mostrando <b>A)</b> síntomas de pudrición a los 2 días de ser inoculado y <b>B)</b> signos de infección fúngica a los 4 días de inoculación.....	23
<b>Figura 17.</b> Estructuras vegetativas de <i>Monilinia</i> <b>A:</b> Conidióforo (40 x) <b>B:</b> Conidias (100x).....	24
<b>Figura 18.</b> Estructuras vegetativas de <i>Alternaria</i> <b>A:</b> Hifas septadas (100x) <b>B:</b> Conidias (40x).....	25
<b>Figura 19.</b> Estructuras vegetativas de <i>Rhizopus</i> <b>A:</b> Estolón y rizoides (10x). <b>B:</b> Esporangiosporas saliendo de los esporangios (40x).....	25
<b>Figura 20.</b> Estructuras vegetativas de <i>Fusarium</i> <b>A:</b> Macroconidias y microconidias (40x) <b>B:</b> Clamidosporas (40x).....	26
<b>Figura 21.</b> Estructuras vegetativas de <i>Botrytis</i> <b>A:</b> Conidióforo (40x) <b>B:</b> Hifas septadas y conidias (100x).....	26
<b>Figura 22.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualizan los productos de PCR de la región ITS de 6 aislados. ....	28
<b>Figura 23.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan las bandas de los productos de PCR del EF1 $\alpha$ de 6 aislados.....	28
<b>Figura 24.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualizan los productos de PCR de 6 aislados de <i>Monilinia fructicola</i> .. ....	29
<b>Figura 25.</b> Reactivación de hongos almacenados en sílica gel. A: Anverso y B: reverso del aislado A02 del género <i>Fusarium</i> con 5 días de ser cultivado en un plato con PDA.....	31
<b>Figura 26.</b> Reactivación de hongos almacenados en PDA con aceite mineral. <b>A:</b> Aislado A09 <b>B:</b> Aislado A13 sembrados en PDA, con 4 días de cultivo.....	31

## **LISTADO DE ANEXOS**

**Anexo A:** Durazno var. Diamante presentando síntoma de pudrición en campo

**Anexo B:** Hongo sembrado en PDA a partir de la muestra L1.

**Anexo C:** Muestras de durazno siendo desinfectadas.

**Anexo D:** Tampón de extracción

**Anexo E:** Tampón TAE 1X

**Anexo F:** Ensamblaje de la secuencia del aislado A11 con Geneoius R.6.

**Anexo G:** Reactivación de hongos en sílica gel.

**Anexo H:** Características macroscópicas de los 6 géneros de hongos fitopatógenos.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>°C:</b>	Grados centígrados
<b>rpm:</b>	revoluciones por minuto
<b>min:</b>	minutos
<b>mL:</b>	mililitros
<b>pb:</b>	pares de bases
<b>mg:</b>	miligramos
<b>ng:</b>	nano gramos
<b>ADN:</b>	ácido Desoxirribonucleico
<b>ITS:</b>	espaciador transcrito interno
<b>EF1<math>\alpha</math>:</b>	factor de elongación 1 alfa
<b>PCR:</b>	reacción en cadena de polimerasa
<b>PDB:</b>	caldo papa dextrosa
<b>PDA:</b>	agar papa dextrosa
<b>cm:</b>	centímetro
<b>V:</b>	voltios
<b><math>\mu</math>m:</b>	micrómetros
<b>ppm:</b>	partes por millón
<b>A:</b>	aislado

## RESUMEN

Las enfermedades postcosecha se encuentran entre los principales problemas fitosanitarios del cultivo de durazno (*Prunus persica*) a nivel mundial. En el Ecuador no existen reportes oficiales, basados en estudios científicos, de los principales patógenos que afectan al durazno después de ser cosechado. El objetivo de este proyecto fue identificar a los hongos filamentosos que están causando síntomas de pudrición post-cosecha en frutos de durazno de la variedad 'Diamante' cosechados de la Granja Experimental del INIAP, ubicada en el sector de Tumbaco de la provincia de Pichincha. Se colectaron 17 frutos de durazno con síntomas de pudrición. Los frutos fueron incubados en cámaras húmedas hasta la aparición de los signos de la enfermedad. A partir de micelio y esporas creciendo en la superficie de los frutos, se aislaron 18 hongos. Se completaron los postulados de Koch para determinar la patogenicidad de los aislados. Adicionalmente, se identificó morfológica y molecularmente a los hongos aislados. Se identificaron los géneros *Monilinia*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizopus* mediante observación microscópica de sus estructuras sexuales. Los aislados pertenecientes al género *Monilinia* fueron identificados como *M. fructicola* mediante iniciadores específicos (IcolaS). El factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) y la región del espaciador interno transcrito (ITS) de los aislados restantes fueron amplificadas y secuenciadas. Mediante búsquedas de BLAST en GeneBank se logró identificarlos a nivel de especie. Además se determinó que la mayoría de duraznos sintomáticos colectados estaban infectados con *M. fructicola* o *A. alternata*, con porcentajes de 35% y 29%. Este trabajo permitirá la exploración de métodos de control que sean efectivos contra los principales patógenos fúngicos que afectan al durazno postcosecha.

### Palabras claves:

- **FITOPATÓGENOS**
- **PCR CONVENCIONAL**
- **ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO**
- **FACTOR DE ELONGACIÓN 1 ALFA**
- **INICIADORES ESPECÍFICOS ICOLAS**

## ABSTRACT

Postharvest diseases are among the main phytosanitary problems of peach (*Prunus persica*) worldwide. In Ecuador, there are no official scientific reports of the main pathogens that affect peach post-harvest. The objective of this project was to identify filamentous fungi that are causing rot symptoms, post-harvest, in 'Diamante' variety peach fruit harvested from Granja Experimental INIAP, located in Tumbaco, province of Pichincha. Seventeen peach fruits with rot symptoms were collected. The fruits were incubated in wet chambers until signs of disease started to appear. From mycelium and spores growing on the surface of the fruits, eighteen of fungi were isolated. Koch's postulates were completed to determine the pathogenicity of the isolates. Additionally, the isolates were identified morphologically and molecularly. *Monilinia*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Botrytis*, *Fusarium* and *Rhizopus* genera were identified by microscopic observation of their sexual structures. Isolates belonging to the genus *Monilinia* were identified as *M. fructicola* using specific primers (IcolaS). The elongation factor 1alpha (EF1 $\alpha$ ) and the internal transcribed spacer region (ITS), of the remaining isolates, were amplified and sequenced. Isolates were identified to species by BLAST searches in GenBank. Furthermore it was determined that most of the symptomatic peaches collected were infected by either *M. fructicola* and *A. alternata*, with 35% and 29% infection rates, respectively. This study will allow the exploration of control methods that are effective against the main fungal pathogens affecting peach fruit post-harvest.

### Key words:

- **PHYTOPATHOGENIC**
- **CONVENTIONAL PCR**
- **INTERNAL TRANSCRIBED SPACER**
- **ELONGATION FACTOR 1 ALPHA**
- **SPECIFIC PRIMERS ICOLAS**

# 1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del Problema

La fruticultura es una actividad agrícola muy importante ya que genera productos alimenticios básicos para el ser humano, que aportan con carbohidratos, proteínas, grasas minerales y vitaminas esenciales. Además, genera ingresos y empleo a pequeños productores. La comercialización a nivel mundial de frutas se ha incrementado en un 40% en los últimos años, en el 2007 el valor mundial de exportaciones fue de 63 billones en comparación con los 38 billones del 2003 (Instituto interamericano de cooperación para la agricultura, 2009).

El durazno es uno de los principales cultivos frutales de clima templado a nivel mundial (Enríquez J., 2001). Sin embargo, en condiciones climáticas desfavorables, como heladas o exceso de lluvias, es muy propenso a plagas y enfermedades (Scatoni I. *et al.* 2010). Las enfermedades fúngicas que afectan al cultivo de durazno son causantes de grandes pérdidas. En el fruto producen síntomas y signos que disminuyen su calidad, llegando a pudrirlo totalmente (Coca M., 2011).

Además, los costos relacionados con el control de hongos son elevados (Agrios G., 2005). A nivel mundial, existe una amplia gama de fitopatógenos identificados que afectan al durazno (Coria, Morales, & Alcántar, 2005). Sin embargo, los géneros de hongos que se encuentran con mayor frecuencia son *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (Rivera C, 2008).

## 1.2 Justificación del Problema

El cultivo de durazno (*Prunus persica*) es considerado como uno de los más importantes a nivel mundial, ayudando a sostener la economía, incrementando las fuentes de trabajo y potenciando el sector agrícola (Coria, Morales, & Alcántar, 2005).

El departamento de Agricultura de Estados Unidos pronóstico que la producción global de melocotones y nectarinas entre septiembre del 2014 y el 2015 sería de 19.9 millones de toneladas métricas (USDA. 2014), además y se prevé que continúe incrementando a 20.5 millones entre el 2015 y 2016 debido a la introducción de Bielorrusia como importante exportador e importador mundial (USDA. 2015).

El durazno es un fruto de hueso muy valioso con el que se puede elaborar una variedad de productos que pueden ser industrializados como mermeladas, jugos, enlatados, etc. También se pueden vender a granel para su consumo en fresco siendo comercializado por los pequeños y grandes distribuidores (Franco D., 2011).

En Ecuador se cultiva en zonas templadas altas de la sierra con altitudes de 2.500-3.000 m.s.n.m, principalmente en las provincias de Tungurahua, Azuay y Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Cotopaxi. Para el año 2008 se reportó una superficie total del cultivo de durazno es de 664 ha en la sierra ecuatoriana, siendo Azuay y Pichincha las de mayor superficie con 245 y 212 ha respectivamente (Vásquez W., 2009).

El rendimiento y la calidad del durazno se ve afectado por muchos fitopatógenos, principalmente fúngicos. En la granja experimental del INIAP se han observado pérdidas que van del 50% hasta el 100% de la producción de la variedad diamante, debido a enfermedades post-cosecha. Para prevenir o tratar adecuadamente una enfermedad es indispensable conocer la identidad del agente causal. La identificación morfológica de microorganismos presenta, en muchos casos, limitaciones debido a que se requiere de taxónomos expertos para poder determinar especies. Por este motivo, se pretende identificar a los agentes causales de la pudrición del durazno por medio de métodos microbiológicos tradicionales y moleculares.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Identificar morfológica y molecularmente hongos causantes de enfermedades postcosecha de durazno (*Prunus persica*) de la variedad diamante en la provincia de Pichincha.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Aislar hongos a partir de duraznos que muestren síntomas de pudrición.
- Determinar cuáles son los hongos causantes de los síntomas de pudrición mediante los postulados de Koch.
- Identificar morfológica y molecularmente a los hongos causantes de enfermedades en el durazno.
- Almacenar los aislamientos a largo plazo para posteriores investigaciones.
- Reportar en revistas científicas las enfermedades encontradas en los frutos de durazno.

### **1.4 Marco Teórico**

#### **1.4.1 Generalidades del Durazno (*Prunus persica*)**

El durazno (*Prunus persica*) o también conocido como melocotón, es un caducifolio (pierde sus hojas en la época de invierno en zonas templadas para resistir bajas temperaturas), diploide y sus características morfológicas difieren según la variedad (Cárdenas & Fischer, 2013).

Bassi & Monet, (2008) definen al durazno como una planta arbustiva que llega a medir entre 4 y 6 m de alto y de 3 a 5 m de diámetro. Poseen hoja plana, con márgenes

aserrados, enteros u ondulados. Su fruto es una drupa de gran tamaño, con forma redonda y semiesférica, con un diámetro de 4 a 10 cm y un peso de alrededor de 90 g.

El fruto posee una pulpa blanca, amarilla o rojiza, que puede estar adherida o separada al hueso o semilla con el endocarpio.

#### **1.4.2 Taxonomía de Durazno**

**Reino** Plantae

**División** Tracheophyta

**Clase** Magnoliopsida

**Orden** Rosales

**Familia** Rosaceae

**Género** Prunus

**Especie** *Prunus persica* (L.) Batsch

**Fuente:** ITIS, 2015

#### **1.4.3 Origen del Durazno**

En un principio se creía que el origen del durazno era Persia (actualmente Irán) de donde se deriva su nombre científico, pero algunos registros escritos y evidencias arqueológicas comprueban su existencia en China alrededor del año 3000 A.C. (Bassi, & Monet, 2008).

Probablemente fue introducida a Persia desde China entre los años 200 y 100 A. C para luego ser llevada a Grecia en los años 370-286 B.C (Ariz Zone Archeology, 2005). Posteriormente se extendió a muchos lugares de Europa. Se cree que fueron los exploradores españoles, entre ellos Cristóbal Colón, en el segundo viaje al nuevo mundo, quienes introdujeron la especie a América (Enríquez J., 2001).

Actualmente se conoce que el durazno se encuentra adaptado en países con zonas templadas-frías que favorecen su crecimiento, entre ellos Ecuador (Alvarón, J. s.f.).

#### **1.4.4 Variedades**

Castro, (1998) indicó que existen más de 15 000 de variedades de durazno en todo el mundo. El durazno es considerado como una especie de gran dinamismo, es decir, que cada año aparecen nuevas variedades en el mercado (Instituto interamericano de cooperación para la agricultura, 2009). Algunas de las variedades que se cultivan en el Ecuador son Diamante, Tejón de Israel, Nectarino, Conservero, Guaytamba, Albaricoque y Monarca. (Elcomercio, 2011).

##### **1.4.4.1 Variedad Diamante**

Fue desarrollada en el Centro Nacional de Pesquisa de fruteiras templadas (CNPFT) - Brasil. Se caracteriza por tener bajo requerimiento de frío (200-300 horas frío), que se entiende como la necesidad de bajas temperaturas para romper el reposo e iniciar la actividad vegetativa (Instituto interamericano de cooperación para la agricultura, 2009). Fue introducida en el Ecuador en 1991 en diferentes granjas del Ecuador, entre ellas la Granja Experimental Tumbaco. Se caracteriza por alcanzar una altura de entre 2.5 y 3.5 m, presenta frutos cónicos con punta pequeña de color amarillo intenso y ligeramente rojizos (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2000). El fruto puede llegar a pesar entre 65-100 g. La coloración de la pulpa es amarilla-oscuro y tiene sabor dulce (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2000).

#### **1.4.4.2 Condiciones de cultivo de durazno var. Diamante**

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, (2000) indico las condiciones ambientales apropiadas para el cultivo de durazno var. Diamante en el Ecuador son las siguientes:

- El rango de temperatura debe estar entre 14.2-18.2°C.
- La altitud adecuada para su crecimiento debe estar en un rango de 2000-2700 m.s.n.m.
- Se requiere precipitación entre 487-961 mm anuales.
- Se puede desarrollar con facilidad en suelos sueltos y arenosos.

#### **1.4.5 Producción de durazno a nivel mundial**

Según la FAO, las plantaciones de durazno y nectarinos se han incrementado en un 20% en el período de 1996-2002, es decir, hubo un aumento anual de 2,5%. Los principales productores a nivel mundial son China, EE.UU, Argentina, Italia, España, Grecia, Irán, Egipto, Turquía, Chile, Francia. Siendo China el principal productor de duraznos y nectarinas a nivel mundial, con una contribución de 43% (Meng-Jun Hu., *et al.*, 2011). En cuanto a Unión Europea participa con más de 30% en la producción mundial, siendo los mayores aportadores Italia, España. En cambio América del Norte y Central producen un 11%, del cual EE.UU participa en un 90% y le sigue el país de México con 150 mil toneladas. En América latina los países con mayor producción son Chile y Argentina. (Ferrada M., 2003).

#### **1.4.6 Producción nacional de durazno**

El durazno tiene una alta demanda debido a su característico sabor dulce, jugoso y de aroma agradable, que es usado en muchos productos como mermeladas, jugos, y principalmente enlatados, además es rico en vitaminas siendo beneficioso para la salud. Según FAOSAT, (2015) la producción de duraznos y nectarina en el 2013 fue de 6,884 mil Tn. En los años 1980 – 1990 Ecuador exportaba a países vecinos como Venezuela y Colombia. Sin embargo, el abandono de tierras y el cese de la producción, permitieron que frutas (entre ellos los duraznos) provenientes de Colombia, Perú y Chile invadan el mercado ecuatoriano (Elcomercio, 2011).

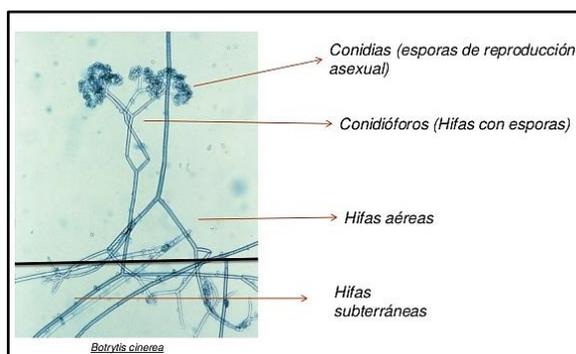
#### **1.4.7 Hongos fitopatógenos**

Los hongos fitopatógenos son responsables de muchas enfermedades pre y post cosecha de diversos cultivos a nivel mundial. Son organismos eucariotas unicelulares o pluricelulares, heterótrofos que pueden reproducirse de forma sexual o asexual. Dichos hongos incluyen a los hongos verdaderos y pseu-hongos (Scattolini A., 2011). Y son causantes de grandes pérdidas en diversos cultivos de importancia económica incluyendo frutales, cereales y hortalizas (Juárez G., *et al.*, 2010). Existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en plantas (Agrios G., 2008).

##### **1.4.7.1 Morfología de hongos filamentosos**

La mayoría de hongos poseen filamentos microscópicos continuos más o menos alargados y ramificados que tienen paredes celulares definidas que en conjunto forman el soma vegetativo o micelio. Las hifas pueden ser septadas o no septadas (cenocíticas), con diámetro de 0.5  $\mu$ m a 100  $\mu$ m. Poseen hifas aéreas y subterráneas (Figura 1).

Algunos hongos poseen micelio formado de células con uno o dos núcleos, mientras que hongos con micelio cenocítico tienen muchos núcleos en una célula continua y tubular. Algunos hongos inferiores no poseen micelio verdadero y producen plasmodio multinucleado, amiboideo y desnudo, o un conjunto de filamentos denominado rizomicelio (Agrios G., 2008).

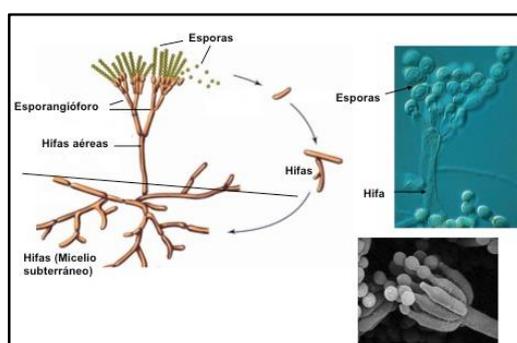


**Figura 1.** Estructura de hongos filamentosos

Fuente: Henríquez V., 2014

#### 1.4.7.2 Reproducción de hongos filamentosos

Los hongos se reproducen de forma sexual y asexual, principalmente por esporas. Las esporas son estructuras que permiten su propagación que se pueden formar mediante procesos sexuales y asexuales. Los hongos inferiores producen sus esporas asexuales dentro de un saco denominado esporangio. Algunos hongos producen conidios que provienen de conidióforos (Agrios G., 2008).



**Figura 2.** Reproducción asexual de hongos filamentosos.

Fuente: Sánchez I., 2015

### 1.4.7.3 Síntomas de enfermedades causadas por hongos

Las enfermedades causadas por hongos producen diferentes tipos de síntomas dependiendo del hospedero, como, por ejemplo: manchas cloróticas y necróticas, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Urbina M., 2011).

### 1.4.7.4 Enfermedades fúngicas del durazno

Existen un gran número de enfermedades que se presentan a lo largo del año, en plantaciones comerciales como en cultivos de pequeños. Las enfermedades aparecen de forma regular en dependencia de las condiciones climáticas y la fenología del huésped (Douglas S., 2003). Entre las enfermedades más comunes se encuentran las siguientes:

#### a. *Podredumbre morena*

La podredumbre morena es una de las enfermedades más importantes que afectan gravemente los cultivos, ataca a flores, brotes y principalmente frutos. Es causada por hongos del género *Monilinia*. A nivel mundial existen tres especies que producen esta enfermedad que son: *M. fructicola*, *M. laxa* y *M. fructigena* (Scatoni I., et al. 2010). Los síntomas se inician con manchas de color café oscuro, que aumentan en tamaño rápidamente y terminan pudriendo o momificando el fruto, sobre la cual se presenta esporulación del hongo (Larraga I., Suárez G., 2011).



**Figura 3.** Fruto afectado por la podredumbre morena.

Fuente: Scatoni I., et al. (2010)

**b. Torque o rulo**

Conocido también como rulo por el enrollamiento que produce en la hoja. Es causado por *Taphrina deformans* que produce ascosporas sobre los tejidos infectados. Fuera de la planta el hongo es levaduriforme, unicelular, y sus ascosporas se forman por gemación. El fruto puede llegar a ser atacado por el hongo, pero no es muy común. (Scatoni I., *et al.* 2010).



**Figura 4.** Hojas atacadas con síntomas de torque.

Fuente: Scatoni I., *et al.* (2010).

**c. Viruela de la Púa**

Es una enfermedad que afecta las ramas productivas de la planta, provocando disminución en el número de frutos cosechados. Causada por el hongo *Fusicoccum amygdali*, el cual produce picnidios en las ramas y masas gelatinosas de conidios. Al principio del brote se observa muerte de las ramas productivas. Además, las ramas afectadas se deshidratan por las toxinas producida por el hongo (Scatoni I., *et al.* 2010).



**Figura 5.** Hoja afectada por la viruela de la púa.

Fuente: Scatoni I., *et al.* (2010).

**d. Podredumbre blanda**

Es una de las enfermedades postcosecha más importantes en durazno y puede ocasionar pérdida total de la cosecha. Causada por el hongo *Rhizopus stolonifer*, posee un micelio cenocítico, su reproducción puede ser asexual, por medio de esporangiosporas, o sexual, mediante zigosporas. Produce pudrición en el fruto, que inicia con pequeñas manchas húmedas de color marrón que se diseminan con rapidez. En frutos podridos presenta micelio blanco que produce esporangióforos con esporangios de color negro (Scatoni I., *et al.*, 2010).

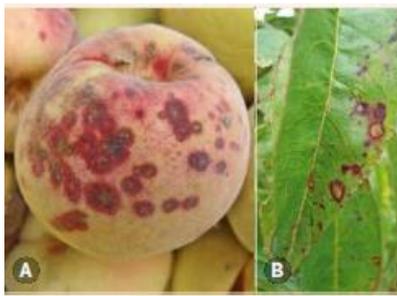


**Figura 6.** Fruto con síntomas de podredumbre blanda

Fuente: Scatoni I., *et al.* (2010).

**e. Tiro de munición**

Producida por *Coryneum beijerinckii*, afecta a las hojas y frutos presentando síntomas como manchas pardas o púrpuras, dispersas, que posteriormente se desprenden dejando perforadas a las hojas (Larraga I., Suárez G., 2011). Las condiciones húmedas favorecen la infección en frutos (Coca M., 2011).



**Figura 7.** Fruto (izquierda) y hoja (derecha) con síntomas de tiro de munición.

Fuente: Coca M., 2011

**f. Pudrición Parda**

Esta enfermedad producida por *Botrytis cinerea*, produce una pudrición similar a la causada por *Monilinia* spp. La superficie podrida del fruto es bastante blanda y puede hundirse fácilmente. El fruto afectado desarrolla una lanosidad de color gris ceniza, conformada por conidióforos y conidias del hongo. La infección causa considerables pérdidas en la producción de durazno, especialmente en época lluviosa (Coca M., 2011).



**Figura 8.** Fruto con síntomas de pudrición parda.

Fuente: Coca M., 2011

**g. Mildiu polvoso**

Es una enfermedad que afecta a hojas y frutos, causada por *Oidium* spp. Produce síntomas como zonas amarillas en el haz de las hojas, y polvo blanquecino en el envés. Los frutos presentan manchas amarillas (Coca M., 2011).



**Figura 9.** Fruto y hojas con síntomas de Mildiu polvoso.

Fuente: Coca M., 2011

#### **h. *Gomosis***

Afecta a los frutos de hueso, pero se desconoce su principal agente causal. En ciertos casos se le atribuye al hongo *Coryneum Beijerinckii*, y en otros a la bacteria *Bacterium gummi*, también puede ser causada por el ataque a ciertos insectos, o debido a heridas causadas por la poda (Larraga I., Suárez G., 2011).

### **1.5 Hipótesis**

Los síntomas presentes en los frutos de durazno de la variedad Diamante de la granja experimental Tumbaco – Ecuador son producidos por *Monilinia* spp.

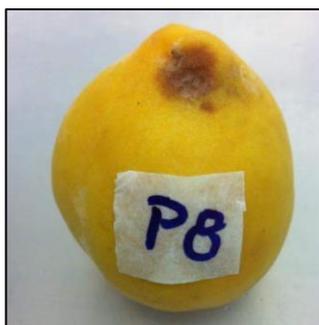
## 2 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Muestreo

Se muestreo en los meses de septiembre y octubre del 2015 a las 10 am, obteniendo un total de 17 duraznos en etapa de maduración que presentaban síntomas de pudrición (Anexo A) en el campo. Las muestras fueron tomadas de la granja experimental del INIAP, en el sector de Tumbaco de la provincia de Pichincha. Los duraznos fueron colocados en fundas plásticas para su traslado al laboratorio y su posterior tratamiento. En el muestro se pudo observar síntomas en el cultivo de durazno que indican la presencia de la enfermedad denominada “Podredumbre parda” o “Brown rot”.

### 2.2 Aislamiento de hongos que afectan al durazno (var. Diamante)

Las muestras fueron desinfectadas superficialmente con agua destilada y una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 1 min, para remover impurezas del ambiente. Luego fueron colocadas en cámaras húmedas diferenciando dos grupos: duraznos que tenían el signo de pudrición en el ápice de la fruta, y en los costados (Figura 10). Posteriormente fueron almacenadas en cámara húmeda durante 10 días a temperatura del laboratorio que llegaba a 27°C, para inducir el aparecimiento de signos del hongo.



**Figura 10.** Muestra 8 presentando mancha café ubicada en el ápice.

Se tomó una cantidad pequeña de micelio de los hongos que fueron apareciendo progresivamente sobre los duraznos, usando un asa bacteriológica estéril. Se sembró los hongos en medio agar papa dextrosa (PDA) con 50 mg/ml de cloranfenicol, manteniendo los cultivos a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 12 h. Utilizando la técnica de estriado, se sembraron dos cajas Petri a partir de cada crecimiento fúngico de los duraznos (Anexo B). Posteriormente se realizaron varios sub-cultivos hasta obtener los aislados totalmente puros en medio PDA y se los mantuvo a temperatura del laboratorio que era aproximadamente de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **2.3 Postulados de Koch: pruebas de patogenicidad**

Mediante los Postulados de Koch se verifico cuáles de los 17 aislados eran causantes de síntomas de pudrición en el durazno. Para las pruebas se utilizó 54 duraznos sanos maduros tomados de la granja experimental de Tumbaco-Pichincha, en su mayoría se hicieron pruebas por duplicado de cada aislado, y otros casos por triplicado debido a que los duraznos sanos ya venían infectados desde el campo, lo cual impedía su utilización en los postulados. Se realizó una lavado superficial de las muestras con agua destilada e hipoclorito de sodio al 0.5% durante 1 min (Anexo C). Luego se inoculó a los duraznos con un pedazo de 1 cm de largo x 1 cm de ancho de PDA de cada aislado

Los duraznos inoculados fueron colocados en cámaras húmedas durante 7 días en la oscuridad a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Luego del primer día se observó que en la mayoría de muestras se formaba una mancha café (síntoma) de diferente tonalidad. En los días siguientes se observó la aparición de micelio sobre los duraznos (signo) provocados por los hongos inoculados. El micelio fúngico empezó a colonizar e invadir el fruto hasta pudrirlo totalmente. Los aislamientos que causaron síntomas fueron aislados nuevamente en medio PDA con cloranfenicol (100ppm) a  $26^\circ\text{C}$ . Se comprobó que las características macroscópicas y microscópicas fueran las mismas del inoculo inicial, confirmando los postulados de Koch.

## **2.4 Identificación morfológica de hongos aislados**

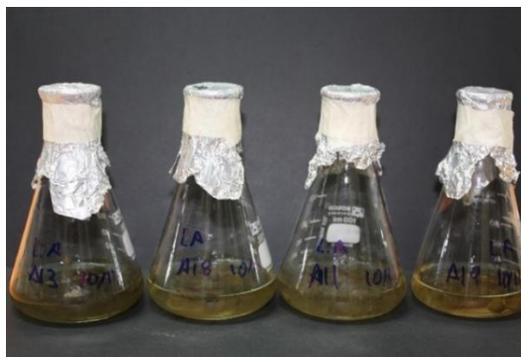
Los hongos que causaron síntomas de pudrición en los duraznos fueron observados bajo el microscopio óptico para visualizar sus estructuras vegetativas y sexuales. Con la ayuda de la clave taxonómica “*Illustrated genera of imperfect fungi*” de Barnett y Hunter (2003), se logró identificar el género al cual pertenecen los aislados. Se tomó una pequeña cantidad de micelio fúngico de 20 días de antigüedad con cinta adhesiva. Se colocó una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos, y sobre esta se puso la cinta adhesiva con el micelio del hongo. Después de 1 min se cubrió a la muestra con un cubreobjetos, y se observó en aumentos de 10x, 40x y 100x.

## **2.5 Identificación molecular de hongos aislados**

### **2.5.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Weising *et al.*, 1995 del libro “*DNA fingerprinting in Plants*” con algunas modificaciones para obtener concentraciones de ADN con mayor pureza. Los hongos con micelio seco y esponjoso fueron sembrados en PDA y se los dejó crecer durante dos semanas. Se pesó entre 30 y 50 mg de muestra. Los aislados para los que no fue posible obtener suficiente muestra a partir de cultivos en PDA fueron sembrados en caldo papa dextrosa (PDB), y se tomó entre 300 y 500 mg de micelio de 8 días de siembra, las muestras del micelio fueron colocadas en un tubo de eppendorf de 2mL (Figura 11). Luego de tomar las muestras se realizó una maceración manual y una mecánica, para mejorar el rompimiento celular de los aislados con apariencia no esponjosa. Para la maceración mecánica, se colocaron 3 perlas de vidrio (2 grandes y 1 pequeñas) en un eppendorf de 2 mL junto con las muestras de los hongos, y 1000  $\mu$ L de buffer de extracción (Anexo D). Las muestras fueron agitadas en un vortex Mixer VM-300 (Gemi; Gemmy Indutrail Corp.), durante 5 min a 2500 rpm.

Posteriormente se colocó 500  $\mu$ L de cloroformo: isoamil alcohol (24:1 v/v). Las muestras fueron incubadas a 55°C durante 30 min a 300 rpm en un termobloque con agitación (ESCO, PROVOCELL).



**Figura 11.** Hongos sembrados en caldo papa dextrosa.

Se procedió a transferir el sobrenadante sin topar la interfase a un tubo nuevo, limpio y estéril. Luego se añadió un volumen (1:1 v/v) de isopropanol, dejando las muestras durante 17 horas en el congelador a -20 °C. Se centrifugo por 6 min a 14000 rpm en una microcentrífuga, o por 6 min más hasta que el pellet se encontrará firme en el tubo. A continuación se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet de ADN con etanol al 70% por una o dos veces, y se dejó secar por 25 min en la cámara de flujo horizontal, y finalmente se disolvió con tampón RTE y con 1  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/ml) durante 30 min en un termobloque. Finalmente el ADN fue cuantificado espectrofotométricamente con un nanoDROP 8000 (Thermo Scientific; Thermo Fisher Scientific Inc.), para lo cual se usó 2  $\mu$ l de agua libre de ARNasas, y 2  $\mu$ l de RTE para encerar el equipo. Las muestras de ADN fueron almacenadas en el congelador a -20°C hasta su posteriormente uso.

### 2.5.3 Amplificación de región ITS, EF1 $\alpha$ e IcolaS

Para determinar la especie de los aislados pertenecientes al género *Monilinia* se utilizaron los iniciadores IcolaS (Gell I. *et al*, 2007) específicos para *M. fructicola*.

Para los demás aislados se amplificó la región ITS y un fragmento del EF1 $\alpha$ , usando los iniciadores universales ITS4-ITS5 (White *et. al.* 1990), y EF1 $\alpha$ 2218-EF1 $\alpha$ 983 (Kurtzman, 2008), respectivamente. Para la amplificación se utilizó GoTaq® Green Master Mix (Promega) que contiene dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa, y Buffer. Los volúmenes de cada componente fueron calculados según las recomendaciones del inserto (Tabla 1).

**Tabla 1.**

Componentes para una reacción de PCR con volumen final de 25 $\mu$ L, para la amplificación de ITS y EF1 $\alpha$  con primers universales y un fragmento de la ITS, específico para *M. fructícola*.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad por reacción</b>	<b>Concentraciones</b>
Go Taq Green Mix	12.5 $\mu$ l	1X
Iniciador hacia delante	1.25 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
Iniciador reverso	1.25 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
ADN	2.5 $\mu$ l	20-200ng/ $\mu$ l
Agua libre de ARNasas	7.5 $\mu$ l	-
<b>Volumen total</b>	<b>25 <math>\mu</math>l</b>	

Se colocaron controles negativos que poseían la misma composición por reacción, a excepción del ADN que fue reemplazado por agua libre de ARNasas. Las condiciones de PCR fueron diferentes para cada par de iniciadores. Para amplificar la región ITS de los aislados y además un fragmento de ADN polimórfico, de esta misma región, específico para *M. fructicola*, la reacción se dio con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos en serie de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 52°C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 2 min, y con una extensión final de 72 °C durante 10 min (Montoliu L., s.f.). Y para el EF1 $\alpha$  se utilizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos en serie de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 7 min, y con una extensión final de 72 °C durante 10 min (Kurtzman, 2008).

### 2.5.4 Electroforesis

Para visualizar los productos de PCR de la región ITS, y amplificación de iniciadores específicos IcolaS se utilizó un gel de 40 mL de agarosa al 1% teñido con 5  $\mu$ l de SYBR® Safe (Invitrogen).

Y para los amplicones de EF1 $\alpha$  se usó un gel de agarosa al 2%, el cual se preparó previamente pesando 0.8 g de agarosa en 40 mL tampón TAE 1X (Anexo E).

Para disolver la agarosa en el tampón se colocó en un microondas durante 1 min. Para la preparación del gel de agarosa al 1% se siguieron los mismos pasos, pero añadiendo 0.4 g de agarosa. Se corrieron 5  $\mu$ L de cada muestra junto con el marcador molecular (Enduro 1Kb DNA Ladder, Labnet). Las condiciones de electroforesis para los diferentes productos se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2**

Condiciones de electroforesis para los productos de PCR de ITS, EF1  $\alpha$ , e IcolaS.

Condiciones de electroforesis	ITS	EF1 $\alpha$	IcolaS
<b>Duración</b>	35 min	50 min	40 min
<b>Voltaje</b>	100 V	80 V	80 V

Los geles fueron observados en un transiluminador (W/TFM-20, UVP). Las muestras que amplificaron las regiones deseadas fueron almacenadas en el congelador a -20°C, para su posterior uso. Los amplicones fueron enviados a Korea del sur a la empresa MACROGEN para su análisis, para ello se tomó 10  $\mu$ l de cada producto de la PCR. La secuenciación de los amplicones se realizó mediante el método Sanger.

### 2.5.5 Búsqueda de homólogos mediante BLAST

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas mediante el programa bioinformático Geneious Versión R6.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.* 2012), que nos permitió encontrar la secuencia consenso para cada una de las muestras (Anexo F). Luego se realizó un alineamiento con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul S. *et al.* 1990) para analizar los porcentajes de identidad de los aislados con las secuencias que se hallaban en la base de datos de GenBank.

### 2.6 Almacenamiento de los aislados

Los aislados fueron almacenados a corto, mediano y largo plazo. Para el almacenamiento a largo plazo se usó la técnica de crioconservación con solución de glicerol. Primero se autoclavó viales de plástico de 2 mL a 15 psi durante 15 min a 121 °C, luego se colocó 500 µL de medio PDB en los tubos. Se sembraron los 16 aislados por triplicado utilizando una aguja entomológica esterilizada. Se dejó crecer durante 5 días a 27°C y posteriormente se agregó 200 µL de glicerol estéril a cada muestra (Figura 12). Los aislados fueron almacenados en el refrigerador a 4°C durante 7 días y posteriormente fueron almacenados en el ultra congelador a -80°C.



**Figura 12.** Crio conservación de aislados.

Nota: A) Aislados almacenados a largo plazo. B) Aislado A05 sembrado en PDB.

Para el almacenamiento a mediano plazo se siguió el protocolo de “Sílice gel” desarrollado por Cañedo y Ames (2004). Se utilizó viales de plástico de 2mL estériles, luego se llenó las  $\frac{3}{4}$  del tubo con perlas de sílica gel. Se colocó 1000  $\mu$ L de agua destilada estéril para retirar el desarrollo miceliano de los hongos, luego se agito con un vortex Mixer VM-300 (Gemi; Gemmy Indutrail Corp.) durante 15 segundos a 2500 rpm. De la suspensión de esporas se tomó 1000  $\mu$ L con una micropipeta, y se dispensó sobre los tubos con sílica previamente etiquetados. Los tubos fueron sellados con parafilm® e incubados a 20 °C por 15 días. Y luego fueron almacenados a 4 °C en la refrigeradora. Los aislados fueron reactivados colocando una perla de sílica gel de cada tubo en un plato conteniendo PDA con 100 ppm de cloranfenicol. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La reactivación permitió determinar la viabilidad del método (Anexo G).

Para el almacenamiento a corto plazo utilizando aceite mineral, siguiendo la metodología de Panizo M, et al (2005), con ligeras modificaciones. Primero se colocó 500  $\mu$ L de medio PDA en viales de plástico de 2 mL con 3 repeticiones para cada aislado (Figura 13). Luego de 5 días de crecimiento se colocó 200  $\mu$ L aceite mineral estéril cubriendo los cultivos de hongos. Para su reactivación a los 7 días de ser almacenado se tomó una porción del micelio del hongo, y se sembró en forma de estriado en una caja con PDA.



**Figura 13.** Almacenamiento a corto plazo.

Nota: **A:** Aislados **B:** A08 sembrado en PDA.

### 3 CAPÍTULO III: RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Se obtuvieron 18 aislamientos a partir de los 17 duraznos recolectadas en la granja experimental del INIAP en Tumbaco. Las muestras presentaban síntomas de pudrición en las partes laterales del fruto (L) y en el ápice (P) lo cual se tomó a consideración al momento de nombrar las muestras. En la Tabla 3 se detallan la fecha de aislamiento, y la muestra de donde se obtuvo cada aislado

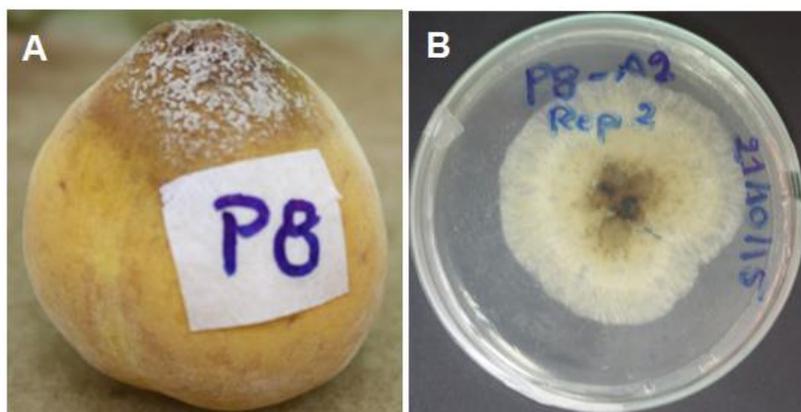
**Tabla 3.**

Fecha de aislamiento y muestra sintomática de durazno a partir de la cual se obtuvieron aislados fúngicos de durazno con síntomas de pudrición.

<b>Aislado</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>Muestra</b>
<b>A01</b>	29/10/2015	P1
<b>A02</b>	29/10/2015	P2
<b>A03</b>	04/11/2015	P3
<b>A04</b>	26/10/2015	P4
<b>A05</b>	26/10/2015	P4
<b>A06</b>	26/10/2015	P5
<b>A07</b>	30/10/2015	P6
<b>A08</b>	21/20/2015	P8
<b>A09</b>	06/11/2015	P9
<b>A10</b>	21/10/2015	L1
<b>A11</b>	21/10/2015	L1
<b>A12</b>	04/11/2015	L2
<b>A13</b>	04/11/2015	L3
<b>A14</b>	07/11/2015	L4
<b>A15</b>	29/09/2015	P10
<b>A16</b>	10/09/2015	P11
<b>A17</b>	12/09/2015	P12
<b>A18</b>	13/09/2015	P13

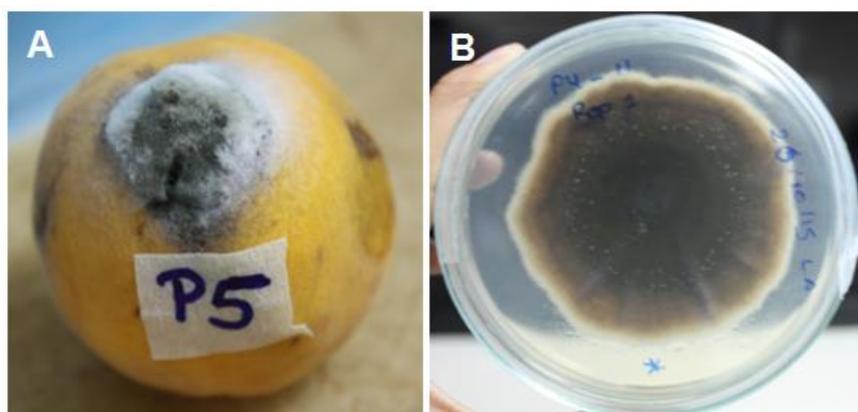
Nota: Síntomas de pudrición en las partes laterales del fruto (L) y en el ápice (P).

Los aislamientos A04, A08, A9, A10, A12, A17, presentaban coloración gris y consistencia arenosa en el fruto. Y coloración verde-claro en medio PDA con cloranfenicol (Figura 14).



**Figura 14.** A) Muestra P8 con presencia de hongo. B) Aislamiento A08 con 6 días de crecimiento en PDA obtenido de la muestra P8.

Así mismo los aislamientos A03, A05, A06, A13 y A16 poseían coloración verde-olivo y con micelio algodonoso en el anverso, y verde-oscuro el reverso de la caja con PDA, mientras que en el fruto presentaba color verde oscuro en el centro y un borde de color blanco (Figura 15). Los aislamientos A15 y A18 poseían micelio de color blanco en el fruto y en PDA.



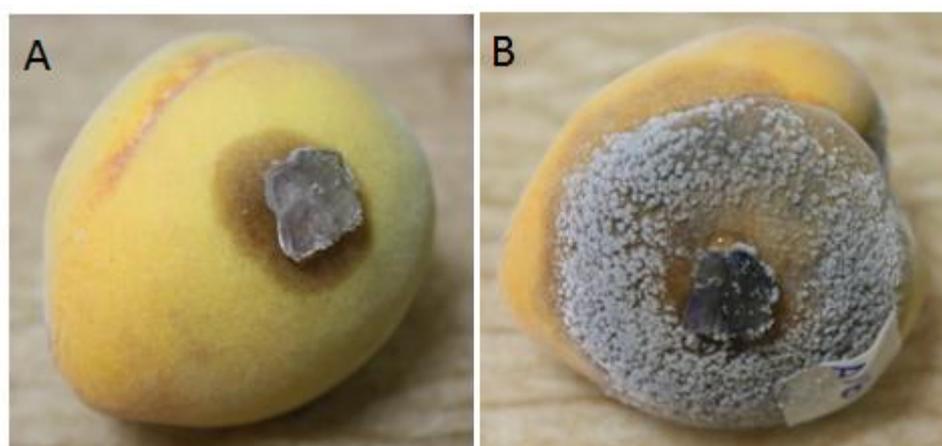
**Figura 15.** Muestra en cámara húmeda y aislamiento.

Nota: A) Muestra P4 con presencia de hongo de color verde con bordes blancos. B) Aislamiento con 6 días de crecimiento en PDA obtenido de la muestra P4.

Se observó que los aislamientos A01, A02 y A11 presentaban características macroscópicas diferentes al resto de aislamientos. El aislado A11 presentaba micelio esponjoso de color gris al inicio de la infección en el fruto. En los 4 primeros días de siembra en PDA, A11 poseía un micelio plano de color crema, luego de 1 mes se produjo hifas cortas de color café claro. En cambio, A02 poseía micelio blanco nieve tanto en el fruto como en el medio PDA. Mientras que A01 presentaba micelio blanquecino y esponjoso en el fruto como en PDA.

### 3.2 Pruebas de patogenicidad: postulados de Koch

Se realizaron los postulados de Koch inoculando duraznos sanos con los 18 aislamientos. Mediante estas pruebas se observó que 16 de los aislamientos causaron síntomas en el fruto. Los duraznos mostraron manchas con varias tonalidades color café a los 2 días de la inoculación, y terminaron pudriéndose al cabo de una semana. Los hongos fueron re-aislados en medio PDA con cloranfenicol (Figura 16).



**Figura 16.** Durazno sano inoculado con A14 mostrando.

Nota: A) síntomas de pudrición a los 2 días de ser inoculado y B) signos de infección fúngica a los 4 días de inoculación.

### 3.3 Identificación morfológica de hongos fitopatógenos

Se analizaron las estructuras sexuales de los 16 aislamientos mediante observación al microscopio con aumentos de 10x, 40x y 100x. Se identificaron 5 géneros diferentes de hongos filamentosos: *Monilinia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, y *Botrytis* (Tabla 4). Sin embargo, dos aislados (A15 y A18) no se lograron identificar, debido a que no produjeron estructuras sexuales, solo se logró observar hifas septadas.

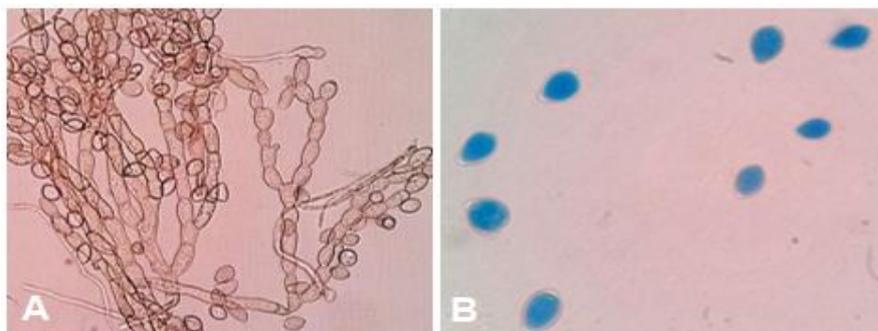
**Tabla 4**

Aislados identificados a nivel de género

Género	Cantidad	Aislados
<i>Rhizopus</i> sp.	1	A01
<i>Fusarium</i> sp.	1	A02
<i>Alternaria</i> sp.	5	A03, A05, A06, A13, A16
<i>Monilinia</i> sp.	6	A04, A08, A09, A10, A17
<i>Botrytis</i> sp.	1	A11

Las características macroscópicas de las colonias de los aislados también fueron útiles para determinar su género (Anexo H). Se encontró que 6 aislados pertenecían a *Monilinia*, 5 al género *Alternaria*, 1 al género *Fusarium*, 1 aislado al género *Rhizopus* y 1 aislado a *Botrytis*. A continuación, se describen las características microscópicas de cada género identificado:

**GÉNERO: *Monilinia***

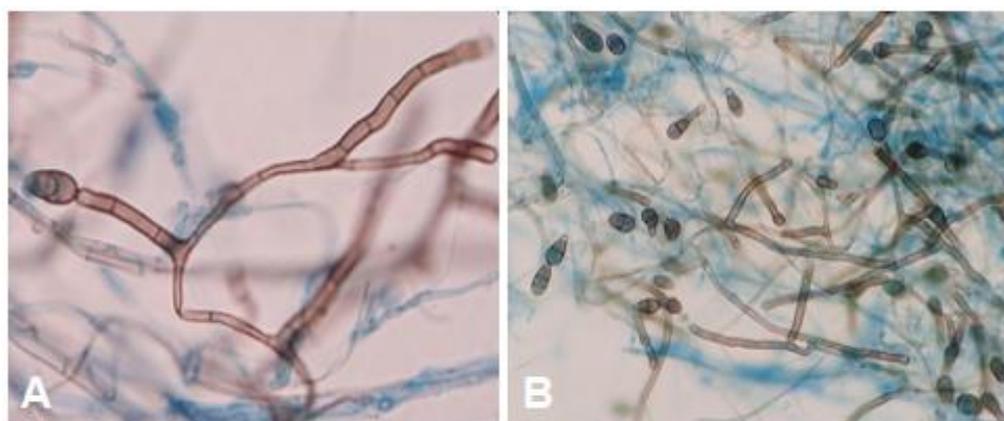


**Figura 17.** Estructuras vegetativas de *Monilinia*.

Nota: A) Conidióforo (40 x) B) Conidias (100x)

**Descripción microscópica:** Presenta hifas septadas. Sus conidióforos son largos, ramificados, y hialinos. La mayoría de conidios poseen forma de elipse y algunos tienen forma globosa, además forman cadenas ramificadas en acrópeta (Figura 17).

**GÉNERO:** *Alternaria*

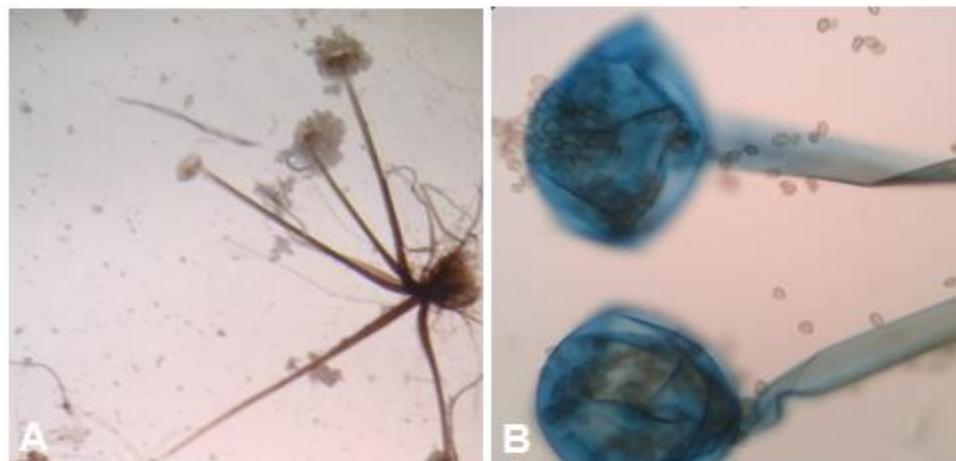


**Figura 18.** Estructuras vegetativas de *Alternaria*.

Nota: **A)** Hifas septadas (100x) **B)** Conidias (40x)

**Descripción microscópica:** Los conidióforos pueden ser cortos o alargados con coloración café-oscuro, pueden tener una o más conidias llegando a formar largas cadenas. Presenta hifas septadas. Además poseen conidias de color café oscuro, con forma ovoide y septos longitudinales o transversales (Figura 18).

**GÉNERO:** *Rhizopus*

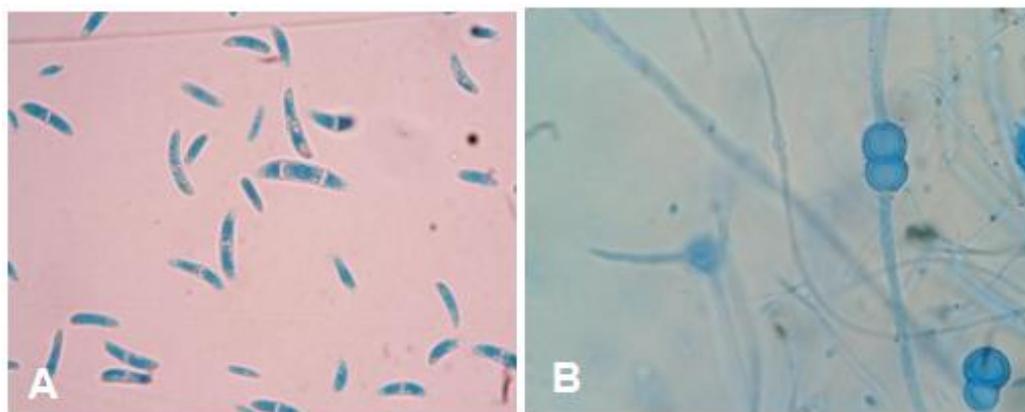


**Figura 19.** Estructuras vegetativas de *Rhizopus*

Nota: **A)** Estolón y rizoides (10x). **B)** Esporangiosporas saliendo de los esporangios (40x).

**Descripción microscópica:** Se caracteriza por tener esporangióforos sin ramificaciones de color pardo oscuros que nacen del estolón (nudo), junto con los rizoides. También posee esporangios esféricos de color café claro, que en su interior contienen esporangiosporas con forma elíptica o redonda y de color café-claro. Presenta hifas cenocíticas (Figura 19).

**GÉNERO:** *Fusarium*

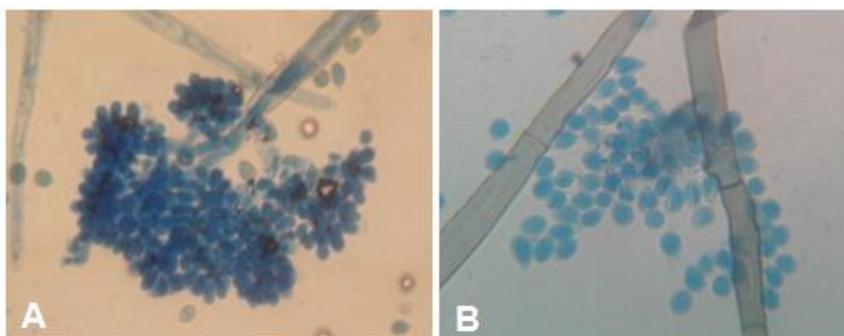


**Figura 20.** Estructuras vegetativas de *Fusarium*.

Nota: A) Macroconidias y microconidias (40x) B) Clamidosporas (40x).

Presentan macroconidias ligeramente curvadas, con 1 o 2 septos longitudinales, y terminaciones puntiagudas. Presenta hifas septadas. Además, posee clamidosporas con forma redonda que pueden encontrarse solas o agrupadas entre dos o más (Figura 20).

**GÉNERO:** *Botrytis*



**Figura 21.** Estructuras vegetativas de *Botrytis*.

Nota: A) Conidióforo (40x) B) Hifas septadas y conidias (100x)

Presentan hifas septadas. Los conidióforos son largos, delgados, hialinos, y ramificados, además se observó que forman agrupaciones cortas de varias conidias en el ápice. Las conidias son hialinas y con forma ovoide (Figura 21).

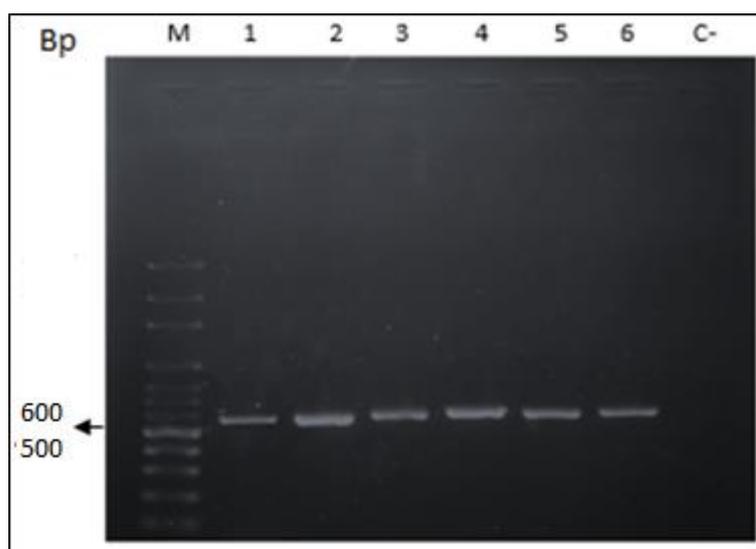
### **3.4 Identificación molecular de hongos fitopatógenos**

#### **3.4.1 Extracción y cuantificación de ADN**

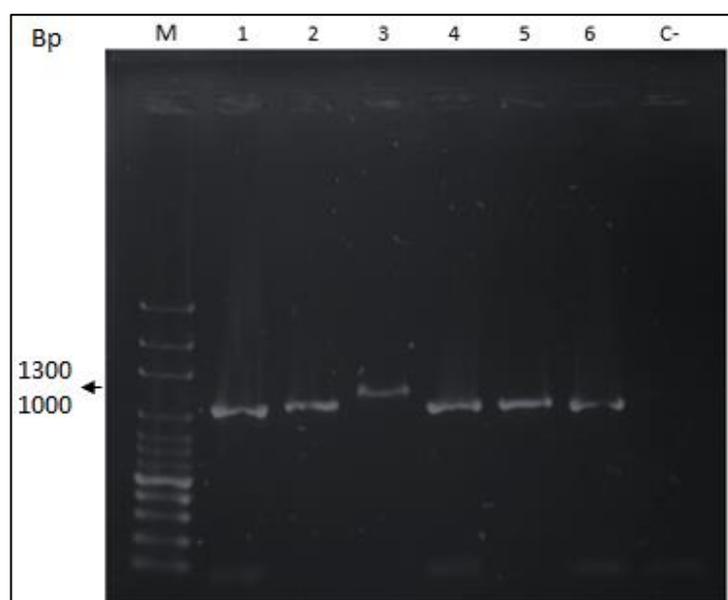
Para la extracción de ADN de aislados pertenecientes a *Monilinia* spp., fueron cultivados en PDB durante 16 días, debido a que la formación de micelio era muy escasa en PDA, y su consistencia muy rígida dificultando la toma de muestra. Los hongos restantes fueron cultivados en medio PDA. Se obtuvo concentraciones de ADN de 20 hasta 200 ng/ul, y se hizo diluciones con RTE de aquellas muestras que tenían altas concentraciones. Las concentraciones finales para la PCR fueron de 20 a 50 ng/ul.

#### **3.4.2 Amplificación de los loci ITS, EF1 $\alpha$ e IcolaS**

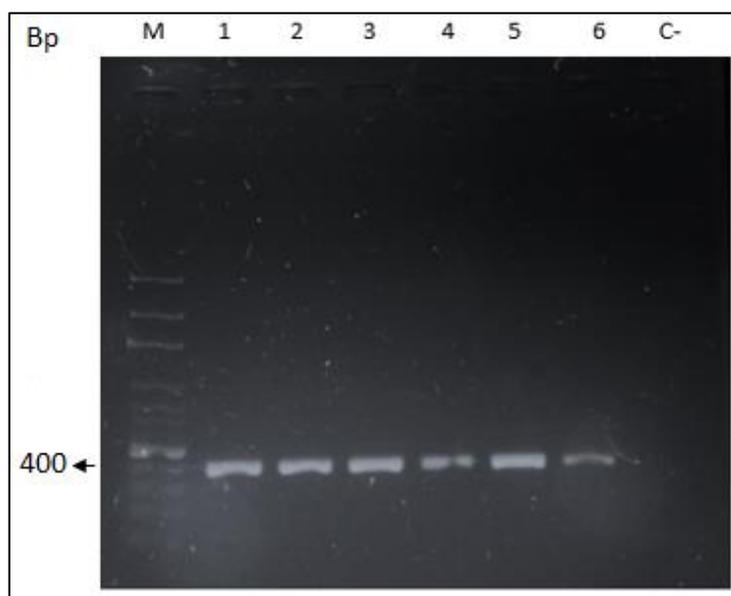
Las bandas que amplificaron la región ITS poseían tamaños que iban de 500 a 600 pb (Figura 22). En cambio, para el EF1 $\alpha$  se obtuvieron fragmentos más grandes que estaban en un rango de 1000 a 1300 bp (Figura 23). El ADN proveniente de aislados de *Monilinia* fue amplificado con los iniciadores IcolaS (Gell I. *et al*, 2007), específicos para la especie *M. fructicola*. El ADN de los 6 aislamientos generó bandas de 400 bp (Figura 24) comprobándose que todos ellos pertenecen a esta especie.



**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualizan los productos de PCR de la región ITS de 6 aislados, 1: A10; 2:A02; 3: A11; 4:A15; 5:A16; A18. M: marcador 100 bp (Labnet). C-: control negativo



**Figura 23.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se visualizan las bandas de los productos de PCR del EF1 $\alpha$  de 6 aislados,1:A10; 2:A02; 3: A11; 4:A15; 5:A16; A18, M: marcador 100 bp (Labnet). C-: control negativo.



**Figura 24.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualizan los productos de PCR de 6 aislados de *Monilinia fructicola*, 1: A04, 2:A08; 3:A09; 4:A10; 5:A12; 6:A14. M: marcador 100 bp (Labnet). C-: control negativo.

### 3.4.3 Ensamblaje de secuencias

Se obtuvieron un total de 24 secuencias, 12 sentido y 12 antisentido, para la región ITS y EF1 $\alpha$ , las cuales fueron limpiadas y ensambladas con el programa bioinformático Geneious Versión R6.1 (Kearse et al., 2012). Mediante el ensamblaje solo se obtuvo 9 secuencias consenso, correspondientes a la región ITS de los aislados y al EF1 $\alpha$  de los aislados. No se logró obtener secuencias consenso para la región ITS del aislado A01, ni para el EF1 $\alpha$  de los aislados A03 y A11 debido a la baja calidad de las secuencias.

### 3.4.4 Búsqueda de secuencias homólogas

Para encontrar el homólogo más cercano de cada una de las secuencias ensambladas se realizaron búsquedas en GenBank utilizando el programa informático BLAST, obteniéndose los resultados que se detallan en la Tabla 5.

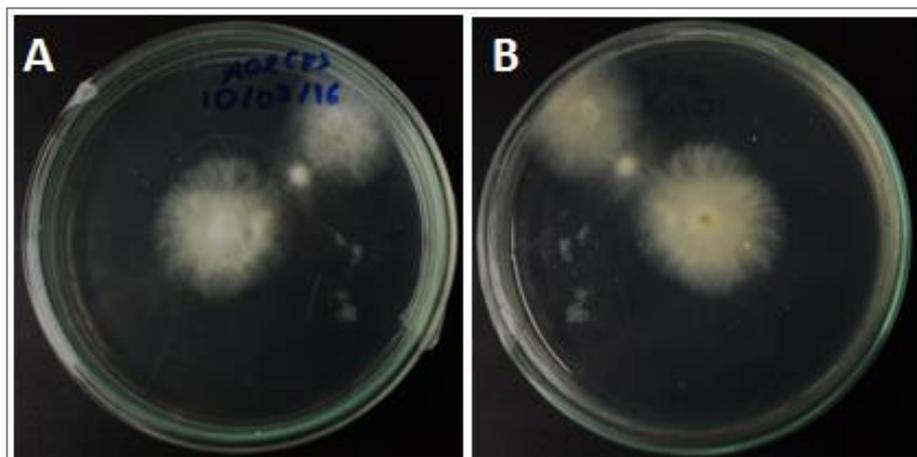
**Tabla 5**

Aislados identificados a nivel de especie mediante búsqueda en la base de datos GenBank con el programa BLAST.

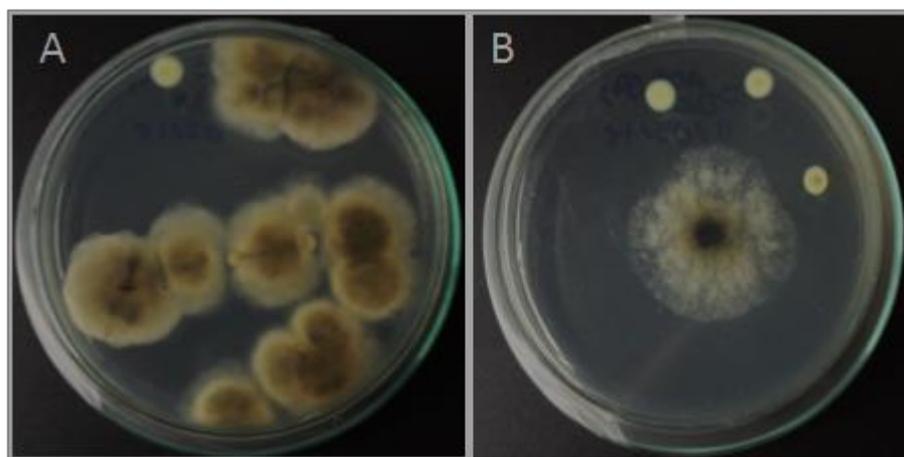
<b>Aislado</b>	<b>Región</b>	<b>Especie</b>	<b>% identidad</b>	<b>N. accesion</b>
<b>A01</b>	EF1 $\alpha$	<i>Rhizopus stolonifer</i>	98	AB512254.1
<b>A02</b>	ITS	<i>Fusarium solani</i>	100	KP136920.1
<b>A11</b>	ITS	<i>Botrytis cinerea</i>	99	KF859918.1
<b>A15</b>	ITS	<i>Diaporthe middletonii</i>	95	KJ197286.1
	EF1 $\alpha$	<i>Diaporthe eres</i>	96	DQ479931.1
<b>A16</b>	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100	HM013812.1
	EF1 $\alpha$	<i>Alternaria alternata</i>	99	KP334736.1
<b>A18</b>	ITS	<i>Diaporthe brasiliensis</i>	97	NR_111844.1
	EF1 $\alpha$	<i>Diaporthe eres</i>	97	DQ479931.1

### 3.5 Almacenamiento de aislamientos

Se almacenó a los 16 aislados que causaron síntomas en durazno utilizando tres métodos diferentes: crio preservación, sílica gel, y PDA con aceite mineral. Se almacenaron dos réplicas de cada aislado en sílica gel, y tres replicados utilizando los métodos restantes, obteniendo un total de 32 tubos en Sílica gel, 48 tubos en PDA y 48 en criopreservación. La viabilidad de los métodos de almacenamiento, mediano (Figura 25) y a corto (Figura 26), fueron evaluados a los 7 días de ser almacenados. Se obtuvo crecimiento de los hongos filamentosos a los 4 días de ser cultivados a partir de los tubos donde fueron almacenados.



**Figura 25.** Reactivación de hongos almacenados en sílica gel. A: Anverso y B: reverso del aislado A02 del género *Fusarium* con 5 días de ser cultivado en un plato con PDA.



**Figura 26.** Reactivación de hongos almacenados en PDA con aceite mineral. A: Aislado A09 B: Aislado A13 sembrados en PDA, con 4 días de cultivo.

Para su identificación dentro del cepario del laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, se asignó un código a cada uno de los 16 hongos fitopatógenos del durazno var. Diamante conservados (Tabla 6).

**Tabla 6**

Códigos de cada aislado

<b>Aislados</b>	<b>Género</b>	<b>Código cepario</b>
<b>A01</b>	<i>Rhizopus</i> sp.	UFAH000001
<b>A02</b>	<i>Fusarium</i> sp.	UFAH000002
<b>A03</b>	<i>Alternaria</i> sp	UFAH000003
<b>A04</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000004
<b>A05</b>	<i>Alternaria</i> sp	UFAH000005
<b>A06</b>	<i>Alternaria</i> sp	UFAH000006
<b>A08</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000007
<b>A09</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000008
<b>A10</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000009
<b>A11</b>	<i>Botrytis</i> sp.	UFAH000010
<b>A12</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000011
<b>A13</b>	<i>Alternaria</i> sp.	UFAH000012
<b>A15</b>	<i>Diaporthe</i> sp.	UFAH000013
<b>A16</b>	<i>Alternaria</i> sp.	UFAH000014
<b>A17</b>	<i>Monilinia</i> sp.	UFAH000015
<b>A18</b>	<i>Diaporthe</i> sp.	UFAH000016

### 3.6 Publicación en reportes de las enfermedades del durazno

Hasta el momento se ha enviado el informe titulado “First report of *Alternaria* rot caused by *Alternaria alternata* on peach in Ecuador” a la revista *Plant Disease*, el cual ha sido aceptado con revisiones.

## 4 CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

Los daños que producen muchos hongos en la cantidad y calidad de la producción del durazno eventualmente repercuten en las fuentes de trabajo que genera este fruto. Para poder contrarrestar los efectos causados por enfermedades, lo primero es conocer cuáles son los patógenos que están afectando a los cultivos de durazno var. Diamante en Ecuador. Para poder diagnosticar correctamente una enfermedad es importante identificar al agente causal tanto morfológica como molecularmente. Para determinar si un hongo con potencial patogénico es el agente causal de una sintomatología específica es necesario completar los postulados de Koch

Se aislaron 18 hongos filamentosos de duraznos con síntomas de pudrición (manchas circulares con varias tonalidades que iban café claro o café oscuro) sobre el tejido. Las manchas son producto de una infección que inicia cuando el inóculo del patógeno (esporas, fragmentos de micelio, o esclerocios) entra en contacto con el huésped, empezando a propagarse, invadiendo e infectando los tejidos, que finalmente terminarán pudriéndose. Sin embargo, para que exista infección e inicio de la enfermedad el inóculo debe germinar, por lo que necesita temperaturas y humedad adecuadas (Agrios G., 2008). Para simular estas condiciones los duraznos fueron colocados en cámaras de humedad.

En cuanto al aislamiento según Arias y Piñeros, (2008) la temperatura y pH son factores importantes al momento de aislar microorganismos, porque estimulan o inhiben su crecimiento. Por consiguiente, las condiciones establecidas para obtener los 18 aislados fueron de  $27 \pm 2$  °C y con pH 3.5, que favorecieron el metabolismo de los hongos encontrados en el durazno.

La identificación mediante la observación de características morfológicas es considerada como una práctica tradicional en estudios de hongos (Suaad S. 2013). Sin embargo, las estructuras de estos organismos se pueden llegar alterar o fragmentar lo que impide una adecuada visualización bajo el microscopio y una correcta identificación (Prats G., 2006). También existen muchos géneros distintos que poseen morfología similar y cuyas diferencias sólo pueden ser identificadas fácilmente por un ojo experto.

En la presente investigación, el aislado A11 fue inicialmente identificado morfológicamente como *Verticilium*, pero después de varios intentos se llegó a obtener sus estructuras intactas, que revelaron una morfología congruente con *Botrytis* sp. El resto de géneros identificados no presentaron complicaciones al momento de observarlos al microscopio.

En el presente estudio, 14 de 16 aislados fueron identificados morfológicamente a nivel de género. Los aislados restantes no pudieron ser identificados debido a la ausencia de esporas en los medios sintéticos donde fueron sembrados. Una de las posibles razones según Prats G., (2006) se debió a que muchos hongos necesitan medios de cultivo con aporte nutritivo como PDA. Aunque en el estudio los aislados A15 y A18 fueron sembrados en medio PDA y jugo V8 no se obtuvo esporulación en ninguno de los dos. Alaniz S. (2012), menciona que algunos hongos para generar esporas necesitan condiciones muy similares a su hábitat natural.

Se identificaron cinco géneros diferentes de hongos fitopatógenos: *Monilinia*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Botrytis*, causantes de síntomas de pudrición en el durazno var. Diamante. Existen apenas dos estudios realizados en Ecuador sobre los hongos que afectan al cultivo de durazno var. Diamante, debido a que esta variedad es relativamente nueva. En el año 2011 Salgado C, identifico la presencia de *Monilinia* en el Ecuador, en las provincias de Pichincha, Carchi, Imbabura y Tungurahua. A nivel mundial *Monilinia* produce la enfermedad denominada “Brown rot” que es más común y destructiva (Douglas S. 2003), que afecta a las frutas de hueso (Ritchie D. 2000)

Mientras que los géneros restantes no han sido reportados previamente en Ecuador, pero se encuentran enlistados como patógenos causantes de pudrición en frutos de durazno, en el portal web de la American Phytopathological Society (Adaskaveg, J. Scott, S. & Scherm, H. 2001). La presencia de dichos géneros en el cultivo de durazno explican los bajos rendimientos obtenidos en la variedad diamante debido a las pérdidas en la cosecha, sin embargo estos pueden ser controlados con fungicidas químicos (Snowdon 1992; Eckert and Ogawa 1988).

En el caso de “Brown rot” en algunos países de Latinoamérica como Uruguay se controla mediante prácticas culturales como eliminación el inóculo primario, y secundario, además se puede controlar con agentes químicos como Capta, Dicarboximidazoles, Benzimidazoles y IBE (Mondino P, 2002).

En Ecuador se realizó un estudio in vitro con *Monilinia* spp. realizado por Borja E. (2011), se determinó que los fungicidas más efectivos fueron Metect, Bravo Tilt, sin embargo se necesitan estudios aplicados en campo para comprobar su efectividad.

En el sector de Tumbaco en la Provincia de Pichincha en el período de septiembre-octubre en el año 2009, el INAMHI reportó altas temperaturas de 16.7 - 16.6 °C y altas precipitaciones anuales que iban de 57.9 a 111.1 mm (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Tumbaco, 2012). Según Douglas S. (2003), menciona que el clima es un factor muy influyente al momento de la aparición y gravedad de las enfermedades, que se tornan difícil de controlar en periodos de alta temperatura, alta humedad, lluvias abundantes. Los resultados de esta investigación indican que las condiciones climáticas en el sector tienden a ser favorables para la aparición de los fitopatógenos específicamente en el cultivo de durazno.

Los métodos tradicionales de identificación de hongos filamentosos, que incluyen la observación microscópica de la morfología y pruebas fisiológicas, pueden tomar demasiado tiempo, lo que los hace inapropiados para el diagnóstico de enfermedades fúngicas que son capaces de esparcirse con celeridad. Además, estos métodos requieren de personal especializado, uso de claves taxonómicas y conocimiento sobre técnicas de cultivo específicas (Pryces T, *et al.*, 2003).

Las especies identificadas mediante PCR con iniciadores específicos o secuenciación de fragmentos del ADN fueron: *Rizhopus stolonifer*, *Monilia fructicola*, *Botrytis cinérea*, *Alternaria alternata*, y *Diaporthe* spp. Los resultados de la presente investigación concuerdan con el estudio de Salgado C, al determinar que el especie con mayor prevalencia en la provincia de Pichincha es *Monilia fructicola*. Las especies restantes no han sido reportadas en anteriormente en el país.

De las nueve secuencias solo siete mostraron porcentajes de identidad superiores a 98% con las secuencias de la base de datos de NCBI. En la mayoría de casos se identificó a la misma especie tanto con ITS como con EF1  $\alpha$ . En el caso de los aislados A15 y A18 se identificaron diferentes especies de *Diaporthe* con cada una de las regiones analizadas; estas secuencias presentaron porcentajes de identidad máxima del 97% con las secuencias almacenadas en GenBank. Posiblemente la especie de *Diaporthe* aislada en este estudio sea un aislado genéticamente distinto, perteneciente a una especie ya descrita, o puede tratarse de una especie nueva.

## 5 CAPITULO V: CONCLUSIONES

Los hongos presentes en el cultivo de durazno var. Diamante de la Provincia de Pichincha, causantes de síntomas de pudrición son: *Monilinia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Rhizopus*, y *Botrytis*.

Las especies con mayor cantidad de aislados obtenidos de durazno con síntomas fueron *Monilinia fructicola* y *Alternaria alternata*.

EL fitopatógeno predominante sobre el cultivo de durazno var. Diamante ubicado en Tumbaco –Pinchincha, en el periodo de septiembre –octubre fue *Monilinia fructicola*.

La identificación molecular permitió la identificación a nivel de género de hongos filamentosos, que en medio sintético difícilmente esporulan.

## 6 CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Realizar nuevas investigaciones con mayor número de muestras, para confirmar los resultados que se obtuvieron en la investigación, usando métodos moleculares como PCR que permiten la detección rápida de hongos.

Para mejorar la observación de placas al microscopio óptico utilizada en la identificación morfológica, se debería realizar un microcultivo siguiendo las indicaciones presentes en el libro de Microbiología Clínica de Prats, G. (2006).

Buscar otras regiones del genoma que permitan la confirmación de las especies identificadas mediante PCR.

Realizar más investigaciones con bases moleculares de los aislados pertenecientes al género de *Diaporthe* para identificar su especie, y determinar si corresponden a una especie nueva presente en Ecuador.

Realizar análisis filogenéticos con los aislados de *Monilinia fructicola* para determinar su variabilidad genética.

## 7 CAPITULO VII: BIBLIOGRAFIA

- Adaskaveg, J. Scott, S. & Scherm, H. (2001). *Diseases of Peach and Nectarine*  
*Peach: Prunus persica (L.) Batsch Nectarine: P.*  
*persica var. nucipersica (Suckow) C.K. Schneid.* Plant Disease Journal.  
 Disponible en: <  
<http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/PeachandNectarine.aspx> >
- Agrios, G. (2008). *Fitopatología*. (5a ed). Elsevier Academic Press.
- Arauz, L. (1998). Importancia de los procariontes fitopatógenos. En L Arauz (Ed).  
*Fitopatología: Un enfoque agroecológico*. (p. 89). San José C.R: Editorial de  
 la universidad de costa rica.
- Arias, E. & Piñeros, P. (2008) Aislamiento e identificación de hongos filamnetosos de  
 muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde. Trabajo de grado.  
 Para optar el título de Microbiólogas Industriales. Bogotá-Colombia:  
 Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias carrera de  
 microbiología industrial.
- Ariz Zone Archeology. (2005). Characterizing records. En. Liverani M. (Ed). Aghram  
 Naharif. The Barkat Oasis (Sha ‘Abiya of ghat, Libyan Shara) in Garamantian  
 Times. Vol 2. (p. 347).
- Alaniz, S. (2012). *Métodos para inducir la esporulación de hongos fitopatógenos*.  
 Disponible:  
 <[http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/12\\_Metodos\\_esporulacion\\_Sandra.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursometodosfito/12_Metodos_esporulacion_Sandra.pdf)>
- Alvarón, J. (s.f.). *Cultivo de melocotonero. Manual práctico para productores*  
 (Proyecto“Fortalecimiento de las capacidades productivas, organizacionales  
 y comerciales de los productores de melocotón en 8 comunidades de la cuenca  
 del río Huaura). Perú: Sn Power y Swisscontact.

- Bassi, D. & Monet, R. (2008). Botany and Taxonomy. En: Layne, D.R. y D. Bassi (eds). *The Peach: botany, production and uses*. (pp. 1-36). Wallingford, UK: CABI
- Barnett, B. & Hunter, B. (2003). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Publishing Burguess Co., Minneapolis.
- Borja, E. (2011). *Evaluación in vitro de fungicidas para el control de Monilinia spp. aislada de duraznos (Prunus persica) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador*. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.
- Cañedo, V. & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
- Cárdenas, J. & Fischer, G. (2013). Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. En: Miranda, D. & Fischer, G. (Eds). *Los frutales caducifolios en Colombia - Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo*. (pp. 21-30). Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas.
- Castro, S. et al. (1998). *Manejo Post-cosecha y Comercialización de Durazno (Prunus persica (L.) Batsch)*. Santafé de Bogotá, Colombia: SENA
- Coria, V., Morales, J. & Alcántar, J. (2005). *Enfermedades del durazno Prunus persica (L.) Batsch. en Michoacán*. (Folleto para productores). Michoacán, México: Campo experimental Uruapan. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias.
- Coca, M. (2011). *Enfermedades del fruto en Durazno (Prunus persica L.)*. (Boletín técnico). Cochabamba, Bolivia: Facultad de Ciencias Agrícolas, pecuarias, forestales y veterinarias. Departamento de fitotecnia y protección vegetal.
- ElComercio., (2011). *El durazno es demandado por su valor nutritivo y su sabor*. Disponible en: < <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/durazno->

demandado-nutritivo-y-sabor-1.html > Recuperado: 26 de septiembre de 2015

Douglas, S. (2003) *Disease control for home peach orchards*. Michigan, EE.UU: Department of Plant Pathology and Ecology.

Enríquez, J. (2001). *Rescate de germoplasma de durazno Prunus persica (L). Batsch establecido en Zacatecas*. Zacatecas, México: Universidad Autónoma de Zacateca.

Ferrada, M. (2003). *Mercado de duraznos y nectarines*. Disponible en: < <http://www.odepa.cl/articulo/mercado-de-duraznos-y-nectarines-2/> > Recuperado: 26 de septiembre de 2015

Franco, D. (2011). *Pulpa de Durazno*. Archivo PDF. Disponible en: < [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/conservas/productos/ConservaDurazno/PulpaDurazno\\_2011\\_10Oct.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/conservas/productos/ConservaDurazno/PulpaDurazno_2011_10Oct.pdf) > Recuperado: 26 de septiembre de 2015

Gell, I. *et al.* (2007). Two different PCR approaches for universal diagnosis of Brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (6), ISSN 2629–2637. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03495.x

Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Tumbaco. (2012). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la parroquia Tumbaco. p. 41. File: Pdf.

Eckert, J. & Ogawa, J. (1988). The Chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annul Review of Phytopathology* 26, 433-469

Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. (2009). V FORO INTERNACIONAL DE AGRONEGOCIOS DE FRUTAS TROPICALES “Hacia la Integración de la Fruticultura Regional”. El Salvador.

- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2000). *Una alternativa de Alta rentabilidad para los Valles Interandinas del Ecuador*. Revista informativa del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones agropecuarias.
- ITIS Report. *Prunus persica* (L.) Batsch. Taxonomic Hierarchy. Disponible en: < [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=24765](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=24765) > Recuperado: 24 de septiembre de 2015
- Juárez G., *et al.*, (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Sta. Catarina Mártir, México: Departamento de Ingeniería Química, Alimentos, Fundación Universidad de las Américas Puebla.
- Ritchie, D. (2000). Brown rot of stone fruits. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1025-01
- Rivera, C. (2008). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*. La Lima, Cortés, Honduras: Departamento de protección vegetal, Fundación Hondureña de investigación agrícola.
- Ruiz, R. (1981). *Manual de cultivos ciruelo y duraznero en el Ecuador*. (Proyecto de desarrollo Rural Integral Tungurahua.). Ambato-Ecuador: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Editorial Departamento de Comunicación del INIAP. (pp 13-36 y p. 37).
- Larraga, I. & Suárez, G. (2011). “*Evaluación de dos tipos de poda y tres inductores de brotación en el cultivo de durazno (Prunus persica) variedad conservero amarillo y determinación de sus estado fenológicos, en dos localidades*”. Universidad técnica de Cotopaxi. Cotopaxi, Ecuador.
- Lucas, G. Campbell, L., & Lucas, L. (1992). Cap. 11 Fungi. General natural and importance. *Introduction to Plant Diseases: Identification and Management*. 2nd Ed. (p. 155). EE.UU: acid free paper.

- Prats, G. (2006). Identificación de los hongos filamentosos. *Micología. Microbiología Clínica*. (1a Reimpresión). (pp.98-99). Buenos Aires, Madrid: Ed. Médica panamericana.
- Mondino, P. (2002). Enfermedades fúngicas del duraznero. Disponible: <<http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Monilinia.htm>> Recuperado el 20 de enero del 2016
- Montoliu, L. (s.f) Protocolo de PCR para DNA genómico. File: .doc.
- Panizo, M. *et al.* (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 25 (1): 1315-2556.
- Pryces, T. *et al.* (2003). Rapid identification of fungi by sequencing the ITS 1 and ITS 2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical Mycology* 41(5):369-81
- Salgado, C. (2011). Identificación molecular de especies de *Monilia spp.* que afectan la producción del durazno *,Prunus persica,* en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador.
- Sánchez, I. (2015). Estructuras microscópicas de hongos filamentosos. Disponible en: <[http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=690&Itemid=771](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=690&Itemid=771)> Recuperado el 21 de septiembre del 2015
- Scatoni, I. *et al.* (2010). *Manual del duraznero. Manejo integrado de plagas y enfermedades.* Soria J. (Ed). Boletín de divulgación N 99. Montevideo, Uruguay: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.
- Scattolini, A. (2011). *Hongos fitopatógenos I.* Disponible en: <[http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2010/Hongos\\_1\\_2010.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/Materiales/Teoricos2010/Hongos_1_2010.pdf)> Recuperado el 21 de septiembre del 2015
- Suaad, S. (013). Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of biological Sciences.* 20, 311-317.

- Snowdon (1992). Snowdon, A.L. (1992) Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Snowdon, A.L. (1992) Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Snowdon, A. (1992). *Post-harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables*. Vol. 2. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Urbina, M. (2011). *Unidad IV. Enfermedades causadas por hongos*. Fitopatología general. Estelí, Nicaragua: Universidad Católica Agropecuaria del trópico seco.
- USDA. (2014). *Fresh Peaches and Cherries: World Markets and Trade*. EE.UU: United States Department of Agriculture & Foreign Agricultural Service.
- USDA. (2015). *Fresh Peaches and Cherries: World Markets and Trade*. EE.UU: United States Department of Agriculture & Foreign Agricultural Service.
- Vásquez, W. 2009. Producción de durazno en Ecuador. *El Huerto, Revista de Agronegocios*, 17: 25 – 26.
- Viteri, P. (s.f.). Descripción técnica de la variedad de durazno diamante (*Prunus persica* (L.) Batsch). Tumbaco, Ecuador: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.