



“Identificación molecular de hongos asociados a síntomas de pudrición de cuello en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) de las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas”

Simaluisa Coro, Dayana Michelle

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 Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D

27 de enero de 2022



Simaluisa Dayana_copyleaks.docx

Scanned on: 18:24 January 27, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	125
Words with Minor Changes	36
Paraphrased Words	39
Ommited Words	0



Financiado e desarrollado por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Identificación molecular de hongos asociados a síntomas de pudrición de cuello en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener) de las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas**” fue realizado por la señorita Simaluisa Coro Dayana Michelle el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero de 2022



Francisco Javier Flores Flor
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

.....
Flores Flor, Francisco Javier

C. C.: 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Simaluisa Coro, Dayana Michelle**, con C.C. 171845795-3, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Identificación molecular de hongos asociados a síntomas de pudrición de cuello en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener) de las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de enero de 2022



Simaluisa Coro Dayana Michelle

C.C.: 171845795-3



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, Simaluisa Coro, Dayana Michelle, con C.C. 171845795-3, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Identificación molecular de hongos asociados a síntomas de pudrición de cuello en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener) de las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Simaluisa Coro Dayana Michelle

C.C.: 171845795-3

Dedicatoria

A mis padres, por su amor, apoyo y ser mis modelos a seguir. Y a mi hermano quien me ha inspirado a ser mejor cada día.

Agradecimientos

A Dios por todas sus bendiciones. A mis padres que han sido mi guía y me han apoyado a lo largo de mi vida. A mi mami, por su amor, compañía y consejos, que me permitieron soportar los peores momentos. A mi papi, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida y por su esfuerzo.

A mi tutor Francisco Flores, quien me permitió contar con su guía. Por toda su tiempo, paciencia y colaboración en esta investigación. Por todos sus consejos que hicieron posible llegar a culminar este proyecto.

Al instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por abrirme sus puertas y permitirme llevar a cabo este proyecto, al personal técnico y científico de los departamentos de Protección vegetal y Biotecnología, que me brindaron todo su apoyo y me impartieron su conocimiento.

A mis amigos y amigas de la universidad y tesis con quienes compartí tantas experiencias, tanto dentro como fuera de las aulas. A mi tulipana por ser mi confidente, compañera de locuras y recordarme lo valioso de la vida. A todos ellos, por escucharme y brindarme apoyo emocional durante este trayecto.

Índice de Contenidos

Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras	13
Listado de Abreviaturas	14
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del Problema	17
Justificación del Problema	19
Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos	21
Capitulo II: Marco Teórico.....	22
Maracuyá.....	22
Producción de Maracuyá en Ecuador.....	22
Importancia Económica del Maracuyá.....	23
Plagas y Enfermedades que Afectan a los Cultivos de Maracuyá	23
Pudrición de Cuello	24
Sintomatología.....	24
Control	25
Aislamiento de Hongos	25

Identificación de Hongos.....	26
Extracción de ADN.....	26
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
Espaciador Interno Transcrito (ITS)	27
Secuenciación de ADN	28
Hipótesis.....	28
Capitulo III: Materiales y Métodos	29
Descripción y Localización del Área de Estudio.....	29
Fase de Campo	29
Fase de Laboratorio	32
Análisis Estadístico	38
Hongos Aislados.....	38
Capítulo IV: Resultados	40
Aislamiento de Hongos Asociados a la Pudrición de Cuello	40
Hongos Aislados.....	40
Identificación Molecular de los Hongos Aislados	50
Cuantificación de ADN	50
Análisis Filogenético.....	52
Distribución de los Hongos Aislados por Género.....	70
Encuesta.....	71
Capítulo V: Discusión	73

Capítulo VI: Conclusiones	78
Capítulo VII: Recomendaciones	79
Referencias	80
Anexos	91

Índice de Tablas

Tabla 1 Coordenadas de las localidades de muestreo	30
Tabla 2 Componentes del tampón de extracción	35
Tabla 3 Volúmenes y componentes de la reacción de PCR	36
Tabla 4 Condiciones de PCR para marcadores moleculares ITS1/ITS4	37
Tabla 5 Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Guayas.....	42
Tabla 6 Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Los Ríos.....	45
Tabla 7 Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas	47
Tabla 8 Cuantificación de ADN de los hongos aislados del tejido de maracuyá.....	50
Tabla 9 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Clonostachys</i>	53
Tabla 10 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Xylogone</i>	55
Tabla 11 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Lasiodiplodia</i>	57
Tabla 12 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Neurospora</i>	59
Tabla 13 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Trichoderma</i>	61
Tabla 14 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Diaporthe</i>	63

Tabla 15 Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género <i>Fusarium</i>	66
---	----

Índice de Figuras

Figura 1 Representación del cistrón de ADN que codifica el ARN ribosomal en hongos	28
Figura 2 Ubicación de los puntos de muestreo en el mapa de Ecuador	31
Figura 3 Síntomas de plantas afectadas con pudrición de cuello en maracuyá	32
Figura 4 Productos amplificados por PCR con los cebadores ITS1/ITS4 a partir de ADN obtenido de micelio de hongos aislados de tejido de maracuyá	51
Figura 5 Árbol filogenético de aislados del género <i>Clonostachys</i> basado en secuencias de la región ITS.....	54
Figura 6 Árbol filogenético de aislados del género <i>Xylogone</i> basado en secuencias de la región ITS.....	56
Figura 7 Árbol filogenético de aislados del género <i>Lasiodiplodia</i> basado en secuencias de la región ITS.....	58
Figura 8 Árbol filogenético de aislados del género <i>Neurospora</i> basado en secuencias de la región ITS.....	60
Figura 9 Árbol filogenético de aislados del género <i>Trichoderma</i> basado en secuencias de la región ITS.....	62
Figura 10 Árbol filogenético de aislados del género <i>Diaporthe</i> basado en secuencias de la región ITS.....	64
Figura 11 Árbol filogenético de aislados del género <i>Fusarium</i> basado en secuencias de la región ITS.....	69
Figura 12 Distribución de los hongos aislados de las muestras de maracuyá asociadas a síntomas de pudrición de cuello por su género	70
Figura 13 Frecuencia de los hongos aislados de las muestras de maracuyá asociadas a síntomas de pudrición de cuello de acuerdo a su género por cada provincia	71

Listado de Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool
- EF-1 α :** Factor de elongación de translocación 1 alfa
- INIAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
- ITS:** Internal Transcribed Spacer
- K2:** Kimura 2-parameteros
- K2+G:** Kimura 2-parameteros + Distribución Gamma
- HKY:** Hasegawa-Kishino-Yano
- MEGA:** Molecular Evolutionary Genetics Analysis
- ML:** Maximum Likelihood
- NAT/C:** Núcleos de Asistencia Técnica y Capacitación
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information
- PCR:** Reacción en Cadena de Polimerasa
- PDA:** Agar Papa-Dextrosa
- ng:** nanogramos
- μ l:** microlitros
- WGS 84:** World Geodetic System 1984

Resumen

El cultivo de maracuyá se ha visto afectado por varios agentes patógenos. De estos los hongos son considerados de alto riesgo ya que una vez infectado el cultivo no pueden ser eliminados y su control se basa en métodos de prevención, razón por la cual es indispensable conocer los hongos que se encuentran afectando a las plantaciones. En este estudio se realizó el aislamiento de hongos del tallo de maracuyá con síntomas de pudrición de cuello, procedentes de cultivos ubicados en las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas. La identificación de los aislamientos se lo hizo en base a la secuenciación de la región ITS usando los primers ITS1/ITS4 y se confirmó mediante la observación microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas. Se obtuvieron un total de 22 aislados de los cuales cuatro se identificaron como *Fusarium solani*, que se conoce es el agente causal de la pudrición de cuello en maracuyá. Se lograron aislar tanto hongos endófitos como patógenos se agruparon en 7 géneros *Fusarium* (12 aislados), *Diaporthe* (cuatro aislados), *Lasiodiplidia* (dos aislados), *Neurospora* (un aislado), *Clonostachys* (un aislado), *Trichoderma* (un aislado) y *Xylogone* (un aislado). Este estudio permite aumentar el conocimiento del microbiota en maracuyá, y se puede usar como base para el desarrollo de métodos de prevención y control de esta enfermedad.

Palabras clave:

- MARACUYÁ
- PUDRICIÓN
- HONGOS
- ITS
- GÉNEROS

Abstract

The passion fruit crop has been affected by several pathogens. Of these, fungi are considered high risk because once the crop is infected, they cannot be eliminated and their control is fundamental based on prevention methods, which is why it is essential to know the fungi that are affecting the plantations. In this study, isolation of passion fruit stem fungi with symptoms of neck rot was carried out from crops located in the provinces of Los Ríos, Guayas and Santo Domingo de los Tsáchilas. Isolates were identified based on sequencing of the ITS region using the ITS1/ITS4 primers and confirmed by microscopic observation of vegetative and reproductive structures. A total of 22 isolates were obtained, of which four were identified as *Fusarium solani* which is known to be the causal agent of root rot in passion fruit. Both endophytic and pathogenic fungi were isolated, which were grouped into 7 genera *Fusarium* (12 isolates), *Diaporthe* (four isolates), *Lasiodiplidia* (two isolates), *Neurospora* (one isolate), *Clonostachys* (one isolate), *Trichoderma* (one isolate) and *Xylogone* (one isolate). This study increases the knowledge of the microbiota in passion fruit, and can be used as a basis for the development of methods for prevention and control of this disease.

Key words:

- **PASSION FRUIT**
- **ROT**
- **FUNGI**
- **ITS**
- **GENERA**

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

En Ecuador, la franja costera es la zona con mayor número de plantaciones de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) con 6.074 ha de un total de 7.459 ha registradas a nivel nacional, distribuidas principalmente en las provincias de: Manabí, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Guayas, las cuales generan una producción total de 22.629 Tm (INEN, 2019), cifras que han sido afectadas o disminuidas por la presencia de patógenos de tipo fúngico, bacteriano y viral. Se conoce que la fusariosis, antracnosis, sarna, bacteriosis y virus de la madera son las principales enfermedades que afectan el cultivo de maracuyá (Torres et al., 1999; Valarezo et al., 2014).

Los hongos como agentes causales de enfermedades en la agricultura, se consideran como un factor limitante en la producción agrícola, provocando pérdidas en cuanto al rendimiento y calidad, conjuntamente con la disminución del tiempo de vida útil de las plantas. Además de aumentar el costo de producción asociado a medidas de control (Juárez, Sosa & López, 2010).

La identificación de los hongos responsables de las enfermedades de las plantas se ha basado en métodos microscópicos, culturales y morfológicos. De este modo en 1970, estudios realizados en el distrito de Auckland de Nueva Zelanda, en cultivos de maracuyá permitieron identificar los hongos *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium sambucinum* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*, basándose en el análisis de las características morfoculturales (velocidad de crecimiento, color de micelio) y características microscópicas (forma, tamaño entre otros) de las estructuras vegetativas y reproductivas (Young, 1970). Sin embargo, estas investigaciones

requieren de gran cantidad de tiempo, trabajo y conocimiento de taxonomía clásica por lo que en la actualidad se han complementado con técnicas moleculares.

Los marcadores moleculares más usados para la identificación de hongos son: el factor de elongación de translocación 1 alfa (EF-1 α) (O'Donnell et al., 1998), β -tubulina (Glass & Donaldson, 1995) y a región del espaciador transcrito interno (ITS) (White et al., 1990).

En el cultivo de *P. edulis*, patógenos como *F. oxyporum* y *F. solani* son los principales agentes reportados como los causantes de la pudrición del cuello y el marchitamiento (Fischer & Rezende, 2008; Ma et al., 2013). Bueno y colaboradores (2014), demostró la presencia de una forma especial que afectaba al cultivo de maracuyá causando la pudrición de cuello, aislando poblaciones de *Fusarium* de plantaciones en los estados de Sao Paulo y Rio de Janeiro, las cuales se caracterizaron evaluando las características morfoculturales y realizando pruebas moleculares con la secuenciación de ITS y EF-1 α . Los resultados obtenidos mostraron especificidad de *F. solani* asociado a maracuyá se propuso nombrarlo como *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*.

Sin embargo, Henao et al. (2018) en su investigación identificaron otras poblaciones de *Fusarium* presentes en maracuyá. Para el estudio se consideraron cinco municipios del Valle del Cauca en Colombia de los cuales se obtuvieron muestras vegetales con síntomas de marchitez o fusariosis, a partir de las que fueron aislados hongos del género *Fusarium* de los que se extrajo el ADN, amplificó la región EF-1 α mediante PCR y se secuenció. Se obtuvo 8 aislamientos del género *Fusarium* identificándose tres especies: *Fusarium incarnatum*, *Fusarium proliferatum* y *F. solani*. Al mismo tiempo, el análisis del árbol filogenético destacó la existencia de variabilidad intraespecífica en los clados, especialmente en el grupo de *F. proliferatum*.

Por otro lado, existe información de otros investigadores quienes han logrado aislar otras especies de hongos que afectan a los cultivos de maracuyá. Es así que Ramírez, Tamayo y Morales en 2017, examinando las características morfológicas lograron diferenciar a los géneros *Phytophthora* y *Colletotrichum*. Por otra parte, el uso PCR e hibridación permitió identificar las especies *Phytophthora nicotianae* var. parasítica, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Cladosporium cladosporioides sensu lato* en plantaciones ubicadas en Colombia. Usando la misma metodología Liu y colaboradores (2021) reportaron por primera vez la presencia de *Phytophthora nicotianae* en la provincia de Guangxi su identificación se basó en características morfológicas y análisis de DNA usando ITS, proteína 1 de unión a GTP relacionado con ras (YPT1) y subunidad 2 del citocromo c oxidasa (COX II).

Considerando lo anteriormente mencionado y ante la necesidad de disponer de información relacionada con la identificación exacta de los microorganismos causantes de una enfermedad, que cada vez presenta mayor incidencia en las principales zonas productoras. Se vuelve necesario el aislamiento e identificación molecular de los hongos asociados a la sintomatología de la pudrición de cuello, con énfasis en la búsqueda de especies de *Fusarium*, los cuales presumiblemente podrían ser los principales causantes de la patología en el cultivo de maracuyá en Ecuador. La información generada, servirá de base para orientar el diseño y desarrollo de alternativas de manejo de la enfermedad en el país.

Justificación del Problema

El cultivo de maracuyá, constituye un componente importante de los principales sistemas de cultivos de alta intensidad de pequeños y medianos productores en diferentes zonas del litoral ecuatoriano; sin embargo, este cultivo se ve dificultado por el incremento de los problemas de tipo fitopatológico que han hecho de esta una actividad

limitada a un ciclo de tipo anual, cuando en condiciones normales la plantación tiene una vida útil de 2-3 años, y que pudiera ser de hasta 4 años, si la plantación es adecuadamente manejada.

Esta investigación se desarrollará con el fin de identificar las especies de hongos asociadas a la enfermedad de pudrición de cuello. El conocimiento de las especies de hongos involucradas en esta patología permitirá contribuir al diseño y desarrollo de nuevos programas de prevención y manejo de la enfermedad, que permita aprovechar durante mayor tiempo su ciclo productivo, además de permitir el desarrollo de futuros trabajos de mejoramiento genético y agronómico del cultivo, la búsqueda de otras especies pasifloráceas con resistencia a estos patógenos; entre otros.

En aras de cumplir con el objetivo planteado, la identificación morfológica de los hongos se la complementará con el uso de la tecnología de códigos de barra de ADN puesto que provee de forma rápida y confiable la identidad taxonómica de una especie mediante la comparación de secuencias cortas del genoma con secuencias existentes en bases de datos. Basado en la facilidad de su amplificación, secuenciación, alineación y la variabilidad se ha seleccionado el marcador molecular ITS de manera que no persistan dudas respecto de la identidad de los organismos incidentes.

Objetivos

Objetivo General

Identificar molecularmente los hongos asociados a síntomas de pudrición de cuello en el cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) de las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas.

Objetivos Específicos

- Aislar hongos asociados a la sintomatología de pudrición de cuello presentes en tejido enfermo de plantas de maracuyá.
- Determinar las especies de los hongos aislados mediante la secuenciación de la región ITS.
- Inferir la filogenia de los hongos aislados.

Capítulo II: Marco Teórico

Maracuyá

El maracuyá (*P. edulis*) es una enredadera vigorosa, perenne y leñosa perteneciente a la familia Passifloraceae, su tiempo de vida varía entre los 3 a 4 años (Knight & Sauls, 1994). Crece en diferentes partes del mundo especialmente en regiones tropicales y subtropicales como América del Sur, el Caribe, Florida, Sudáfrica y Asia, siendo los mayores productores a nivel mundial: Brasil, Colombia, Perú y Ecuador (Almeida et al., 2005).

P. edulis posee dos variedades principales: el maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) adaptada a elevaciones bajas y cálida y el maracuyá morado (*Passiflora edulis* Sims) adaptada a grandes alturas en los trópicos (Cañizares & Jaramillo, 2015; Queensland Department of Agriculture and Fisheries, 2016).

El maracuyá se desarrolla preferentemente en lugares con temperatura promedio de 21-24 °C; a alturas desde el nivel del mar hasta los 1000 m de altitud. En las regiones subtropicales, la producción de maracuyá se da durante todo el año, pero su producción es más elevada entre los meses de abril-septiembre y diciembre-enero (Cañizares & Jaramillo, 2015).

Producción de Maracuyá en Ecuador

En Ecuador, los cultivos se encuentran distribuidos en mayor parte en provincias de la región costa (Esmeraldas, Manabí, Guayas, El Oro, Los Ríos y Santo Domingo de los Tsáchilas) y en ciertas provincias de la sierra y oriente (Cañizares & Jaramillo, 2015). Según datos obtenidos en la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) en el año 2019, los cultivos de maracuyá ocuparon una superficie

sembrada de 7.459 ha. Las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Guayas presentaron una superficie de 1178, 913 y 398 ha respectivamente (INEC, 2019).

La producción de maracuyá en Ecuador se encuentra a cargo de miles de pequeños y medianos productores (Valarezo et al., 2014). Siendo la variedad amarilla, la más cultivada y difundida en Ecuador debido a que tiene un mayor rendimiento industrial (Quito & García, 2021).

Importancia Económica del Maracuyá

El maracuyá por su sabor intenso y ácido, así como también por sus propiedades nutritivas ha sido reconocido como una fruta potencialmente comercial. Y se estima que el 97 % de la producción nacional está destinada a la exportación hacia mercados internacionales en forma de concentrados, jugos, pulpa y fruta fresca; y un 3% al mercado local (Cañizares & Jaramillo, 2015).

Las exportaciones de esta fruta como jugo, fruta fresca y congelados alcanzaron en el 2021 las 13.101 toneladas, lo que equivale 32.367.968 USD según lo reportado por el Banco central del Ecuador (SIPA, 2022). Sin embargo, aunque Ecuador se encuentra posicionado como uno de los principales exportadores su contribución al PIB no es significativo ya que su volumen de exportación es mediano o bajo, por lo que es clasificando dentro de la categoría de productos no tradicionales (Muñoz, 2011).

Plagas y Enfermedades que Afectan a los Cultivos de Maracuyá

Con la expansión de las áreas de cultivo de maracuyá también emergieron una serie de enfermedades (Fischer & Rezende, 2008). Las plagas y su impacto van variando dependiendo de la región, época y manejo agronómico. Entre las plagas que

afectan a *P. edulis* están insectos como: lepidópteros defoliadores, ácaros, moscas de botones florales, trips (arañuelas), *Phyllophaga* spp. entre otros (Valarezo et al., 2014).

Entre las principales enfermedades reportadas que se mencionan están: virosis por el virus de la madera de la fruta de la pasión (PWV), virus del mosaico del pepino (CMV), pudrición del pie (*Phytophthora* sp.), roña o verrugosis (*Cladosporium herbarum*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), septoriosis (*Septoria passiflorae*), la marchitez por *Fusarium* (*F. oxysporum*) y pudrición del cuello (*F. solani*) (Ortiz, 2012; Valarezo et al., 2014; Yeturu et al., 2018).

Pudrición de Cuello

Una de las principales enfermedades que afecta a *P. edulis* f. *flavicarpa* es la pudrición de cuello causada por *F. solani* (Bueno et al., 2014). La enfermedad ha sido reportada en Estado Unidos, China, Brasil, varias zonas de África entre otros países (Sseyewaa et al., 1999; Zhou et al., 2021). Esta enfermedad ha provocado una significativa disminución de la productividad, así como también la migración de los cultivos a zonas libres del patógeno (Bueno et al., 2014; Fischer & Rezende, 2008). Países productores como Brasil, Colombia y China reportaron pérdidas de entre el 90% y 100% en los cultivos comerciales, causadas por la presencia del hongo *F. solani* (Marostega et al., 2019; C. Wang et al., 2021).

Sintomatología

Los síntomas inician con el marchitamiento de las puntas de los brotes, cambio de color en las ramas a un verde pálido, decaimiento de las ramas, pardeamiento o cuarteamiento de la corteza y defoliación (Fischer & Rezende, 2008). Posteriormente, la enfermedad produce necrosis y marchitamiento de las ramas, pero sin cambios en la coloración de haces vasculares. En el cuello de la planta, se produce chancro desde la

epidermis progresando hacia la médula, el cual presenta coloración que cambia de un tono rojizo a café (Ortiz & Hoyos, 2012).

Ya en estados avanzados, las raíces presentan procesos necróticos y el cuello sufre de pudrición severa. La necrosis puede alcanzar 2 a 10 cm por encima del suelo y puede migrar a las raíces; en el tallo se van tornando de color rojizo las decoloraciones vasculares, asimismo se puede observar la aparición de peritecios rojizos en el tejido del cuello. En la parte aérea se puede observar marchitamiento, frutos con rugosidades en diferentes fases de madurez adheridos a la planta (Fischer & Rezende, 2008; Ortiz et al., 2014; Ortiz & Hoyos, 2012).

Control

Los métodos más eficaces para el control y prevención de las enfermedades fúngicas en las plantas son el cultivo de variedades resistentes a hongos (Ssekyewa et al., 1999), uso de prácticas agrícolas adecuadas y aplicación de fungicidas y biocontroladores (Fischer et al., 2010).

En la búsqueda de variedades resistentes a la pudrición de cuello se ha probado que los miembros *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora nitida* y *Passiflora cincinnata* de la familia de las *Passifloraceas* son las especies con mejor relación de productividad-tolerancia para la producción de híbridos en el cultivo de maracuyá (Marostega et al., 2021).

Aislamiento de Hongos

En su mayoría las enfermedades que afectan a las plantas se pueden diagnosticar observándolas a simple vista o mediante el microscopio. Sin embargo, en algunas enfermedades bacterianas y fungosas es imposible identificar el patógeno debido a alguna de las siguientes razones: Existe una mezcla con uno o más

contaminantes, no se han desarrollado aun los cuerpos fructíferos o esporas característicos, la enfermedad se puede deber a uno o varios patógenos que se asemejan morfológicamente entre sí o es una enfermedad causada por un nuevo microorganismo (Agrios, 2005; Hyde et al., 2011).

El aislamiento se lo realiza a partir del tejido enfermo de una planta, usando medios nutritivos y en algunos casos medios específicos. A partir de los aislados obtenidos se comienza el estudio de sus características (Agrios, 2005).

Identificación de Hongos

Los métodos microbiológicos son los más usados en la identificación y detección de patógenos, estos se basan en la determinación de características tanto bioquímicas como fisiológicas, no obstante, estos análisis son laboriosos y requieren de gran cantidad de tiempo y experiencia. Por lo que el uso de métodos moleculares ha contribuido a facilitar la identificación del agente patógeno de manera rápida y precisa (Raja et al., 2017; Ramírez et al., 2017).

En la identificación de hongos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más utilizadas conjuntamente con el análisis de la variabilidad de los genes ribosómicos, como el espaciador transcrito interno (ITS). De esta manera, la identificación de microorganismos, tiene mayor validez ya que se analizan tanto los atributos fenotípicos como genotípicos (Angarita et al., 2017).

Extracción de ADN

La extracción es el proceso de aislamiento y purificación de moléculas de ADN, que se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. Los diferentes métodos de extracción aprovechan la carga negativa del ADN originada por los grupos fosfatos que forman parte de los nucleótidos. Esta característica es aprovechada ya sea

para disolver el ADN en soluciones acuosas, precipitar el ADN o la unión a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Cornejo et al., 2014).

A lo largo de los años se han ido diseñando una variedad de protocolos con la finalidad de obtener una calidad y cantidad apropiadas, así como evitar la presencia de inhibidores. Y de esta manera obtener datos confiables y reproducibles (Rodrigues et al., 2018).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es un ensayo enzimático, que permiten la obtención de grandes cantidades de ADN, usando secuencias que delimitan la zona de amplificación y permiten obtener millones de copias de una región de interés que generalmente varía de entre 500 a 1000 pares de bases.

Cada ensayo requiere de la presencia del ADN molde, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa. La ADN polimerasa es la enzima clave encargada de unir los nucleótidos para formar el producto de la PCR. Los nucleótidos que son los cuatro pares de base que conforman el ADN. Los cebadores son fragmentos cortos de aproximadamente de 20 pares encargados de especificar el producto objetivo que se va a amplificar (Cornejo et al., 2014; Garibyan & Avashia, 2013).

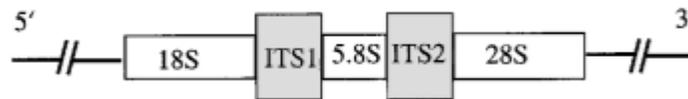
Espaciador Interno Transcrito (ITS)

En eucariotas, existen dos espaciadores internos transcritos (ITS1 y ITS2) que separan las subunidades 18S, 5.8S y 28S (Figura 1). En hongos, el análisis del cistron del ARN ribosómico (ARNr) es una parte fundamental de la sistemática molecular (Aslam et al., 2017; Hebert & Gregory, 2005). La región ITS es el locus más usado para la identificación de un gran número de hongos a nivel de género y especie, esto se debe

a que tiene una alta variabilidad interespecífica y una baja variabilidad intraespecífica dentro de las regiones ITS1 e ITS2 (Iwen et al., 2002).

Figura 1

Representación del cistron de ADN que codifica el ARN ribosomal en hongos.



Nota. El gráfico muestra el orden y posición de las regiones ITS. Tomada de Iwen et al., 2002.

Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN consiste en determinar el orden de las bases: adenina, timina, guanina y citosina, que se encuentran formando un fragmento del ADN (Xiang & Liang-Dong, 2012). Las secuencias se comparan con bases de datos y se les puede asignar una identidad basada en el porcentaje de coincidencia. La secuenciación puede aplicarse en campos como la metagenómica, filogenética y codificación de barras de ADN (Peay et al., 2008).

Hipótesis

Los aislados obtenidos de plantas de maracuyá con síntomas de pudrición de cuello corresponden a varios géneros de hongos.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Descripción y Localización del Área de Estudio

El presente estudio se realizó entre los meses de septiembre de 2021 a enero del 2022, en dos fases de campo y laboratorio.

Fase de Campo

El presente estudio involucró muestras de plantas enfermas colectadas de 8 fincas ubicadas en las provincias de Los Ríos, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas (Figura 2), sus coordenadas se encuentran descritas en la Tabla 1. El muestreo contó con el apoyo del personal técnico de los Núcleos de Asistencia Técnica y Capacitación (NAT/C) de las Estaciones Experimentales, Tropical Pichilingue y Santo Domingo de los Tsáchilas, quienes tienen conocimiento de localidades representativas con el cultivo de maracuyá con problemas de pudrición del cuello.

Las muestras se colocaron en bolsas de papel y se etiquetaron con el código de muestra y localización. Posteriormente, las muestras fueron depositadas en un contenedor térmico para mantenerlas a 4°C (AGROCALIDAD, 2018) para ser transportadas al Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, del INIAP, en la ciudad de Quevedo, provincia de Los Ríos.

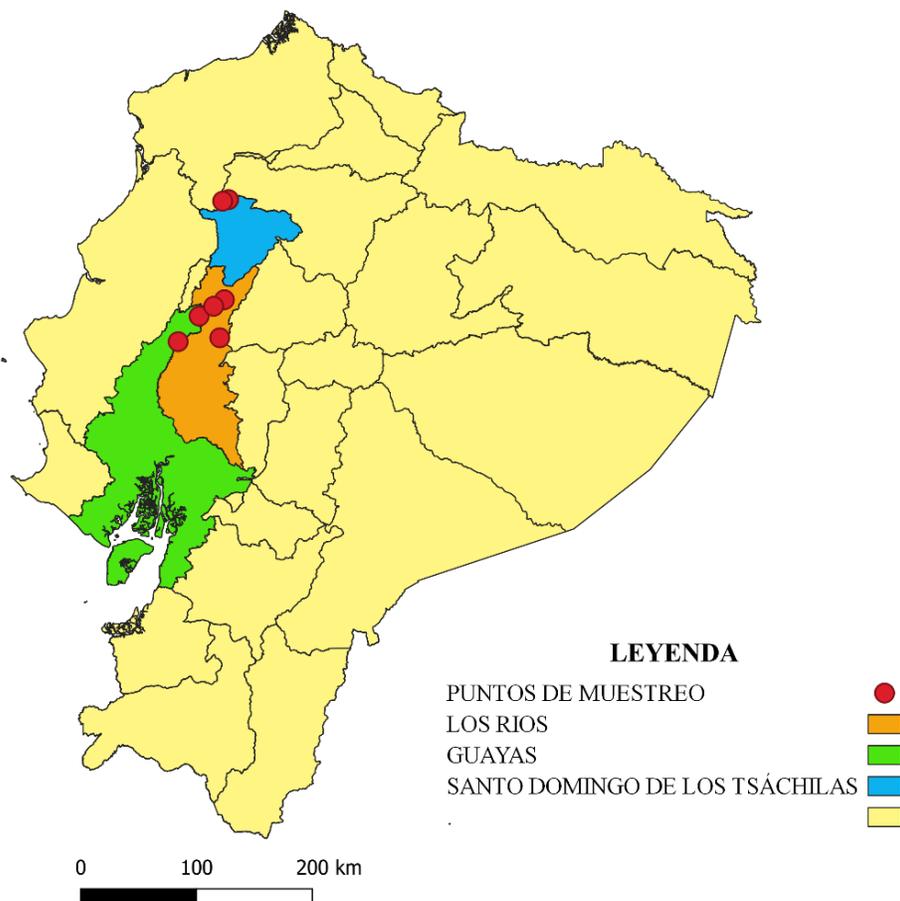
Tabla 1*Coordenadas de las localidades de muestreo.*

Provincia	Cantón	Muestra	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m.)
Guayas	Empalme	MG11I	-0.933033107	-79.54804074	109.1
	Balzar	MG21I	-1.13286323	-79.71083019	98.9
Los Ríos	Quevedo	MR11I	-1.10201302	-79.38716018	85.1
	Valencia	MR21I	-0.80423634	-79.35151844	166
	Buena Fe	MR31I	-0.85597069	-79.43533958	127.2
	Mocache	MR41I	-1.11840982	-79.49104129	84.7
Santo Domingo de los	Puerto Quito	MS11I	-0.02151134	-79.32075798	277.8
	Puerto Quito	MS12I	-0.02221222	-79.32062438	272.1
Tsáchilas	Concordia	MS21I	-0.03333206S	-79.3651343	256.1

Nota. El sistema de coordenadas usado en la tabla es WGS84. MG: Maracuyá-Guayas, MR: Maracuyá-Los Ríos; MS: Maracuyá-Santo Domingo de los Tsáchilas.

Figura 2

Ubicación de los puntos de muestreo en el mapa de Ecuador.



Nota. Imagen creada con el programa QGIS v2.14.

Características de la Muestra. Se recolectaron plantas que presentaron síntomas como: clorosis leve y uniforme en algunas hojas (Figura 3A) además de marchitez (Figura 3B), pardeamiento o cuarteamiento de la corteza (Figura 3C), chancro en el cuello de tonalidad rojiza o café y aparición de peritecios (Figura 3D) (Ortiz & Hoyos, 2012).

Figura 3

Síntomas de plantas afectadas con pudrición de cuello en maracuyá.



Nota: A) Clorosis leve y uniforme en hojas, B) Marchitez, C) Peritecios y cuarteamiento de corteza, D) Peritecios observados en el estereoscopio a 25X.

Levantamiento de Encuesta. Durante la visita al predio se realizarán una serie de 25 preguntas en listadas en una encuesta (Anexos 1) dirigida al responsable del cultivo con la finalidad de conocer la percepción que tiene acerca de la enfermedad: presencia de sintomatología asociada a la pudrición de cuello y control fitosanitario; así como información del cultivo: superficie sembrada, edad, variedad, origen y asociación.

Fase de Laboratorio

Las actividades relacionadas con el aislamiento y manejo de los organismos fitopatógenos y posteriormente las relacionadas con la identificación molecular se

realizaron en los Laboratorios de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal y de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, del INIAP, en la ciudad de Quevedo, provincia de Los Ríos.

Aislamiento de Hongos. Las muestras de tallo se lavaron y cortaron en trozos de cinco mm, posteriormente se desinfecto con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y se lavó tres veces en agua destilada estéril y seco con papel absorbente estéril. Después de la desinfección se sembraron 5 cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) suplementado con cloranfenicol (0.5 g/L) por muestra, en cada caja se depositaron 4 explantes, se sellaron e incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ de tres a siete días con 12 horas de luz y doce horas de oscuridad (Duarte et al., 2016; Henao-Henao et al., 2018; Postic et al., 2012).

Obtención de Cultivos Puros. Los hongos que crezcan de los tejidos sembrados, se replicaron en medio de cultivo PDA hasta la obtención de cultivos puros, considerados así cuando repetían las mismas características en cada siembra. Una vez se logró obtener los cultivos puros estos se conservaron en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA inclinado a 4°C (Duarte et al., 2016).

Caracterización de los aislados. Los aislamientos se sembrarán en medio de cultivo PDA y se incubaron a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 días. Se observó características macroscópicas relacionadas a la forma de crecimiento de la colonia, aspecto, textura y coloración del haz y envés de las placas. Para las características microscópicas se colocó una pequeña muestra de micelio sobre una gota de azul de lactofenol y se observó al microscopio (Cañedo & Ames, 2004; Leslie & Summerell, 2006) diferenciándose las estructuras vegetativas y reproductivas presentes en cada especie de hongo aislada (Leslie & Summerell, 2006; Liu et al., 2021; Ramírez et al., 2017).

Identificación Molecular. Extracción de ADN. Las placas con los diferentes aislados fueron llevados al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, del INIAP, donde se llevó a cabo el proceso de a extracción de ADN usando el protocolo de Doyle & Doyle (1987) modificado por Faleiro et al. (2002) y modificado por Lozada (2013). La extracción del ADN inició a partir del micelio obtenido de los cultivos puros, el cual se recogió, depositó en un mortero de porcelana esterilizado y se le añadió nitrógeno líquido, para después ser molido hasta obtenerse un polvo fino, que fue transferido a un tubo de 2 ml. Siguiendo con el protocolo se añadió 800 µl de buffer (Tabla 2) y mezcló en vórtex, para luego agregarse 5 µl de proteinasa K (20 mg/µl) y dejar a incubar en baño maría a 65°C por 1 hora con inversiones cada 15 minutos. Luego de retirarse del baño maría se centrifugó a 21 952 g por 16 minutos y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml, al cual se le adicionó 55 µl de CTAB al 7% y 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se procedió a mezclar por inversión y vórtex hasta que se formó una emulsión y se llevó a centrifugar a 21 952 g por 16 minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se lo traspasó a un tubo de 2 ml al que se le agregó 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclándolo y centrifugándolo al igual que en el paso anterior. El sobrenadante recuperado se pasó a tubos de 1.5 ml y se le añadió 700 µl de etanol absoluto a -20°C, mezclando por inversión y almacenando por 1 a horas a -20°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 21 952 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante dejando solo un pellet blanco al fondo del tubo. Seguidos se realizaron lavados con etanol al 70% los cuales variaron de 3 a 4 dependiendo de la muestra y se lo dejó reposar por 12 horas hasta que se evapore el etanol. Para luego, el ADN extraído resuspenderlo en 100 µl de tampón T.E. con RNAsa

(20mg/ml) e incubarlo por 30 minutos a 37°C y finalmente almacenarlo a -20°C (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 2

Componentes del tampón de extracción.

Reactivos Stock	Concentración Final	Cantidad para 15 muestras
CTAB al 7%	2.80%	6 ml
NaCl 5 M	1.3M	4 ml
EDTA 0.5 M	20mM	0.6 ml
Tris – HCl 1M (pH 8.0)	100mM	1.5 ml
PVP 40	1%	0.15 g
β-Mercaptoetanol	0.20%	30 µl
Agua MILLI-Q		Aforar a 15 ml

Nota. Recuperado de Morillo & Miño, 2011.

Cuantificación de Pureza del ADN Extraído. La concentración y pureza se determinó usando un espectrofotómetro Hitachi U-2900 UV-VIS. Se inició estableciendo el blanco para lo que se usó agua. Se secó las celdas y una vez establecido el blanco, se colocó 20 µl de la muestra de ADN en 1980 µl de agua y se midió la absorbancia a 280 y 260 nm. Con los valores obtenidos se calculó la concentración de ADN en ng/µl usando la ecuación 1 y la pureza se la obtuvo del resultado de la ecuación 2 para lo que se empleó los rangos 260/280 nm, considerando los valores ~1.8 como ADN “puro” (Cornejo et al., 2015).

Ecuación 1

$$\text{Concentración de ADN} = A_{260} \times [\text{factor de dilución}] \times [\text{factor de conversión}]$$

Para el factor de conversión se considera una absorbancia de 1.0 a 260 nm que corresponde con una concentración de 50 ng/ μ l, por lo que el factor de conversión a emplearse es igual a 50.

Ecuación 2

$$\text{Pureza} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Amplificación por PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional se aplicó para amplificar la región ITS usando los cebadores universales ITS1 5'CCG TAG GTG AAC CTG CGG 3' e ITS4 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3', descritos por White et al., (1990). Se realizó una mezcla de: Taq polimerasa, primers, agua ultra pura, cloruro de magnesio, buffer, dNTPs y DNA molde en los volúmenes y concentraciones descritas en la Tabla 3 basado en los protocolos descritos por Morillo & Miño (2011). Los productos de la PCR se almacenaron a 4°C.

Tabla 3

Volúmenes y componentes de la reacción de PCR para 25 μ l.

Componentes	Concentración	Volumen por reacción (μ l)
Agua ultra pura	-	15
Buffer PCR	5 X	2.5
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	25 mM	1.5
dNTPs	5 mM	0.5
Primer forward	10 μ M	2
Primer reverse	10 μ M	2

Componentes	Concentración	Volumen por reacción (µl)
Taq polimerasa	5 u	0.5
Muestra de ADN	20 ng/µl	1
Total		25

Nota. Recuperado de Morillo & Miño, 2011.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler, siguiendo las condiciones especificadas por Morillo & Miño (2011) y descritas en la Tabla 4.

Tabla 4

Condiciones de PCR para marcadores moleculares ITS1/ITS4.

Procedimiento	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	94	1 min	35
Alineación	55	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

Nota. Recuperado de Morillo & Miño, 2011.

Evaluación y Secuenciación de ADN. Para la evaluación de los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 1.5% y se corrió a 100 voltios por 30 minutos (Cornejo et al., 2015). Los amplicones del gen ITS fueron enviados a la empresa Macrogen en Corea del sur para su secuenciación.

Análisis Bioinformático. Posteriormente, las secuencias de cada uno de los individuos se limpiaron y ensamblaron usando el programa BioEdit 7.2.5 y luego se compararon con las contenidas en las bases de datos: Fusarium MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>), Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) (Geiser et al., 2004) y National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta “Basic local alignment search tool” (BLAST) (Retana et al., 2018). Continuando con el análisis, se seleccionó las secuencias que presentaron altos porcentajes de similitud con las secuencias en estudio, las mismas que fueron sometidas a un alineamiento múltiple usando el programa MUSCLE. El árbol filogenético se lo realizó usando el programa MEGA 11 aplicando el algoritmo de Máxima Verosimilitud (ML) en conjunto con el mejor modelo de evolución determinado por el programa y un análisis de 1000 réplicas (Bootstrap) (Salazar-González et al., 2016). Como acotación final se usó secuencia de *Penicillium chrysogenum* (X76120.1) como especie fuera del grupo en construcción de los árboles filogenéticos.

Análisis Estadístico

Hongos Aislados

Una vez conocida la identidad de los hongos, se llenó la matriz con la siguiente información: código de muestra, identidad del hongo, localidad y provincia. A partir de ellos mediante herramientas de estadística descriptiva se va a desarrollar información

sobre frecuencias y distribución de los hongos presentes en esta sintomatología la información se va analizar para cada provincia y a nivel nacional.

Capítulo IV: Resultados

Aislamiento de Hongos Asociados a la Pudrición de Cuello

Hongos Aislados

Un total de 22 hongos fueron aislados de las muestras de maracuyá con síntomas de pudrición de cuello, siendo ocho correspondientes a la provincia de Guayas, seis a Los Ríos y ocho a Santo Domingo de los Tsáchilas.

El análisis morfológico permitió formar 6 grupos de aislados, los cuales según las claves taxonómicas descritas por Barnett y Hunter (1998). Un grupo formado por dos aislados, que presentaron abundante micelio aéreo de color inicialmente blanco, cambiando a color gris claro y con el tiempo cambiando a negro y conidios maduros de coloración café, con un septo medio e inmaduros característico para *Lasiodiplodia* sp.(Alves et al., 2007).

El segundo grupo de 12 aislados el cual presentó micelio blanco abundante y mostró formación de macroconidias, microconidias y clamidosporas que son típicas de las especies de *Fusarium* según lo descrito por Leslie y Summerell (2006).

Un tercer grupo de cuatro hongos que mostró micelio denso de color blanco, con tonalidades amarillas-cafés. Y formación de peritecios negros después de 15 días. Se observó conidios redondos características que coinciden con el género *Diaporthe* (Gomes et al., 2013).

Un cuarto grupo con un aislado con micelio de color verde con anillos concéntricos. Se observó fiálides y conidios que coincide a lo descrito por Barnett y Hunter (1998) para *Trichoderma*.

Un quinto grupo con un aislado que presenta micelio flocoso de color amarillo y color negro en el reverso. Y presencia de artrosporas, lo cual concuerda con Kang y colaboradores (2010) para *Xylogone*.

Un sexto grupo con dos aislados, con micelio de color blanco con tonalidades amarillas. No se logró identificar estructuras reproductoras.

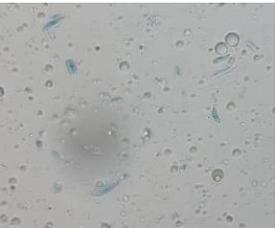
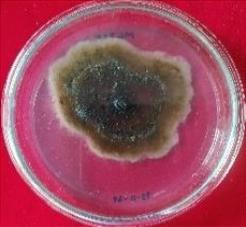
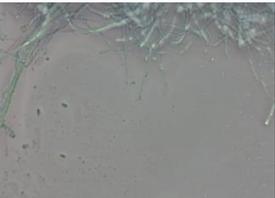
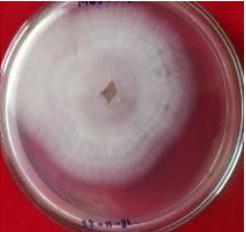
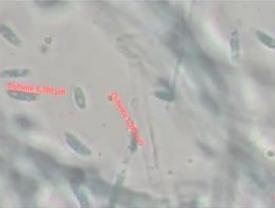
En las muestras provenientes de la provincia del Guayas, se determinó que pertenecían a los géneros *Fusarium*, *Lasiodiplodia* y *Diaporthe* (Tabla 5). Los hongos con presencia macroconidias y micronidias se los asigno como *Fusarium*.

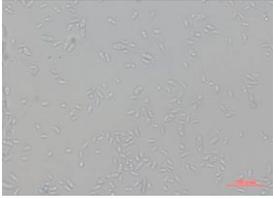
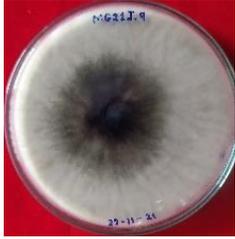
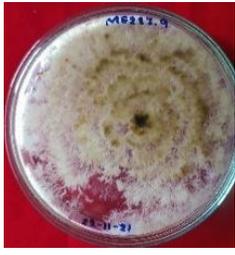
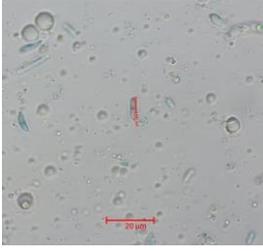
De las muestras obtenidas de Los Ríos se diferenció el género *Fusarium* en el cual se logró distinguir clamidosporas, macroconidias y microconidias, además también existió la presencia de los géneros *Diaporthe* y *Xialogone* (Tabla 6).

Finalmente, de las muestras obtenidas de Santo Domingo de los Tsáchilas se logró distinguir los aislados del género *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* y *Trichoderma* (Tabla 7).

Tabla 5

Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Guayas.

Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MG111.1			Micelio de color blanco con tonalidades rosáceas		Macroconidias y Microconidias	<i>Fusarium</i>
MG211.1			Micelio poco abundante de color blanco		Conidios e hifas septadas	<i>Diaporthe</i>
MG211.2			Micelio de color blanco con tonalidades violáceas		Microconidias	<i>Fusarium</i>

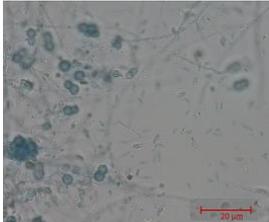
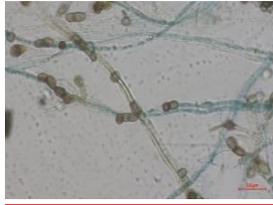
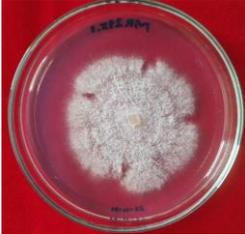
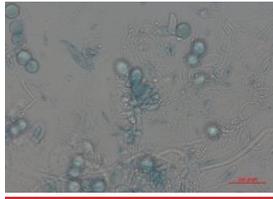
Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MG211.3			Micelio de color blanco con tonalidades amarillas		Microconidias	<i>Fusarium</i>
MG211.7			Abundante micelio de color gris y blanco		Conidios bicelulares	<i>Lasiodiplodia</i>
MG211.9			Micelio denso de color blanco con tonalidades amarillas y cafés		Hifas no septadas y esporangio	<i>Diaporthe</i>
MG211.11			Micelio de color blanco y de aspecto algodonoso		Presencia de macroconidias y microconidias	<i>Fusarium</i>

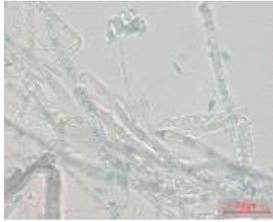
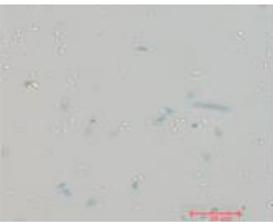
Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MG21A.1			Micelio de color blanco y poco abundante		Macroconidias	<i>Fusarium</i>

Nota. Las fotos en el microscopio fueron tomadas con aumento 63X; MG: Maracuyá-Guayas.

Tabla 6

Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Los Ríos.

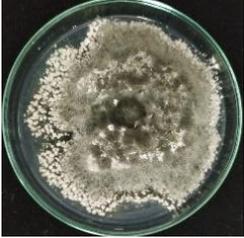
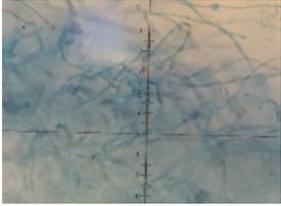
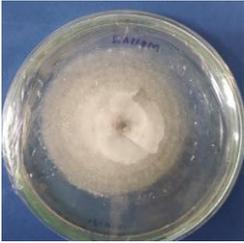
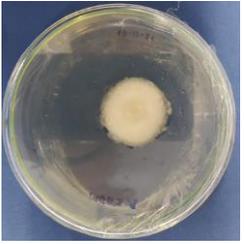
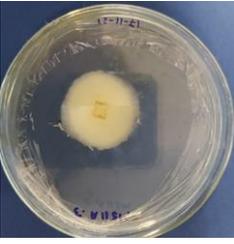
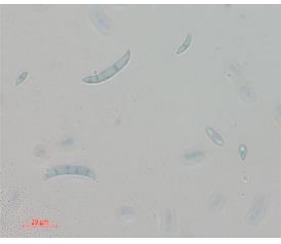
Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MR111.2			Micelio de aspecto algodonoso de color blanco y amarillo		Microconidias y clamidosporas	<i>Fusarium</i>
MR111.3			Hongo de color amarillo y micelio de color blanco		Presencia de artrosporas	<i>Xylogone</i>
MR211.1			Micelio de aspecto algodonoso de color blanco-rosáceo		Clamidosporas, macroconidias y microconidias	<i>Fusarium</i>

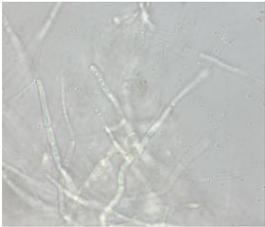
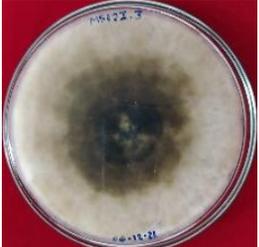
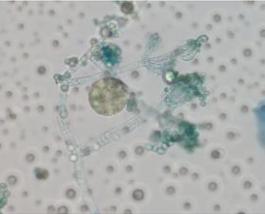
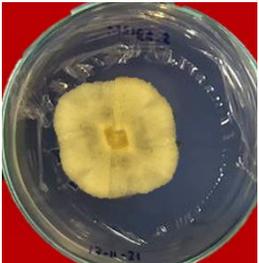
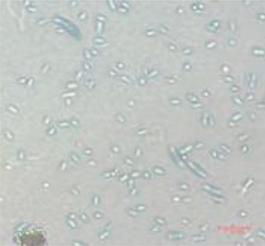
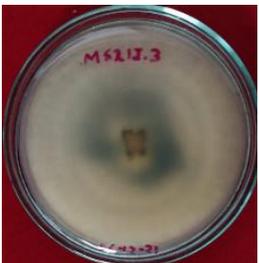
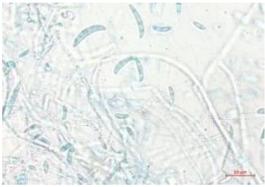
Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MR311.3			Micelio de color blanco y rosáceo poco abundante		Microconidias	<i>Fusarium</i>
MR311.5			Micelio de color blanco con tonalidades violetas		Macroconidias y microconidias	<i>Fusarium</i>
MR411.2			Micelio denso de color blanco		Conidios	<i>Diaporthe</i>

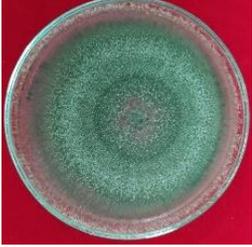
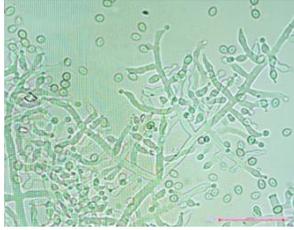
Nota. Las fotos en el microscopio fueron tomadas con aumento 63X; MR: Maracuyá-Los Ríos.

Tabla 7

Resultados de la caracterización secundaria y morfológica de los hongos asociados a maracuyá en las muestras obtenidas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MS111.4			Micelio de color gris		<i>Conidios inmaduros (unicelulares)</i>	<i>Lasiodiplodia</i>
MS11A.2			Hongo de color amarillo-tomate con micelio de color blanco		Hifas	--
MS11A.3			Abundante micelio de color blanco		Macroconidias y microconidias	<i>Fusarium</i>

Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MS12I.1			Micelio blanco con tonalidades amarillas		Hifas, no se observa estructuras reproductivas	--
MS12I.3			Micelio denso de color blanco		Conidios	<i>Diaporthe</i>
MS12A.2			Hongo de color amarillo con micelio blanco		Microconidias y macroconidias	<i>Fusarium</i>
MS21I.3			Hongo con tonalidades moradas y micelio blanco		Microconidias y macroconidias	<i>Fusarium</i>

Código	Anverso	Reverso	Descripción	Microscopio	Descripción	Género
MS21A.1			Micelio de color blanco con halos concentricos		Conidios y fialide	<i>Trichoderma</i>

Nota. Las fotos en el microscopio fueron tomadas con aumento 63X. MS: Maracuyá-Santo Domingo de los Tsáchilas.

Identificación Molecular de los Hongos Aislados

Cuantificación de ADN

El método de extracción de ADN empleado permitió obtener una cantidad y calidad adecuada de ADN como se muestra en la Tabla 8, en promedio la concentración es de 655.68 ng/μl y la relación de 260nm/280nm es de 1,92 valor que se encuentra en el rango de 1.8 a 2 indicando una buena calidad de ADN para la mayoría de las muestras. También se observó valores entre 1.6-1.8 rango que se indica una calidad de ADN aceptable. Y una muestra con un valor menor a 1.6 lo que puede indicar contaminación por compuestos aromáticos o proteínas.

Tabla 8

Cuantificación de ADN de los hongos aislados del tejido de maracuyá.

Código muestra	Pureza	Concentración de ADN (ng/ul)
Guayas		
MG11I.1	1,93	290
MG21I.1	1,92	480
MG21I.2	1,93	560
MG21I.3	2	680
MG21I.7	1,88	375
MG21I.9	1,64	115
MG21I.11	1,93	580
MG21A.1	1,97	1005
Los Ríos		
MR11I.2	1,95	750
MR11I.3	1,54	185
MR21I.1	2,03	1430
MR31I.3	1,6	160
MR31I.5	2,03	875
MR41I.2	1,70	280
Santo Domingo de los Tsáchilas		
MS11I.4	2,08	1225
MS11A.2	1,94	175
MS11A.3	2,06	515

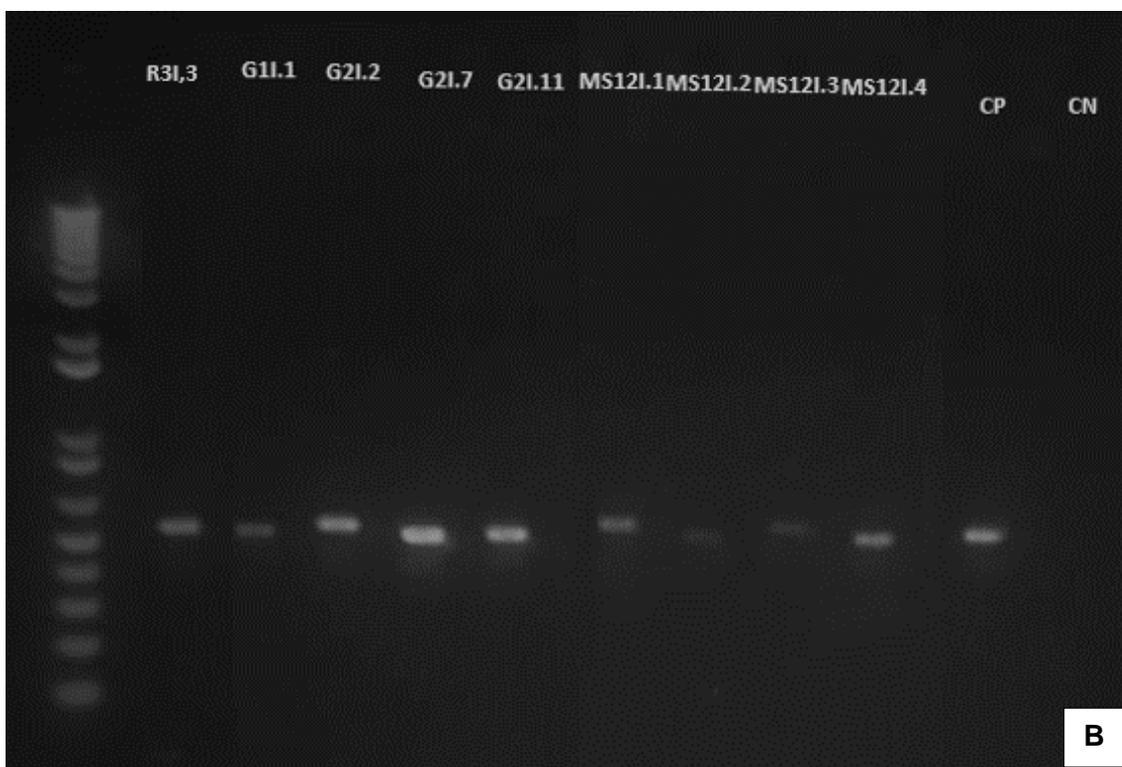
Código muestra	Pureza	Concentración de ADN (ng/ul)
MS12I.1	1,62	105
MS12I.3	2,00	400
MS12A.2	2,10	2620
MS21I.3	2,06	710
MS21A.1	2,03	1205

Las reacciones de PCR con los cebadores ITS1/ITS4 generaron fragmentos del tamaño esperado de 500 a 550 pb como se muestra en la Figura 4.

Figura 4

Productos amplificados por PCR con los cebadores ITS1/ITS4 a partir de ADN obtenido de micelio de hongos aislados de tejido de maracuyá.





Nota: (A) Línea 1: marcador molecular 1kb de Invitrogen; 2 a 11 y 14 a 16: aislamientos identificados; 13: control positivo (ADN de *Fusarium oxysporum*); 14: Control negativo (H₂O). (B) Línea 1: marcador molecular 1kb de Invitrogen; 2 a 9: aislamientos identificados; 10: control positivo (ADN de *Fusarium oxysporum*); 11: Control negativo (H₂O).

Análisis Filogenético

En la Tabla 9, se puede notar que de acuerdo al porcentaje de identidad igual al 100% el aislado MS11A.2 pertenecen al género *Bionectria*. La mayor similitud del aislado MS11A.2 con respecto a una especie fue con *Clonostachys rosea* f. *catenulata* con 98.79%.

Tabla 9

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Clonostachys.

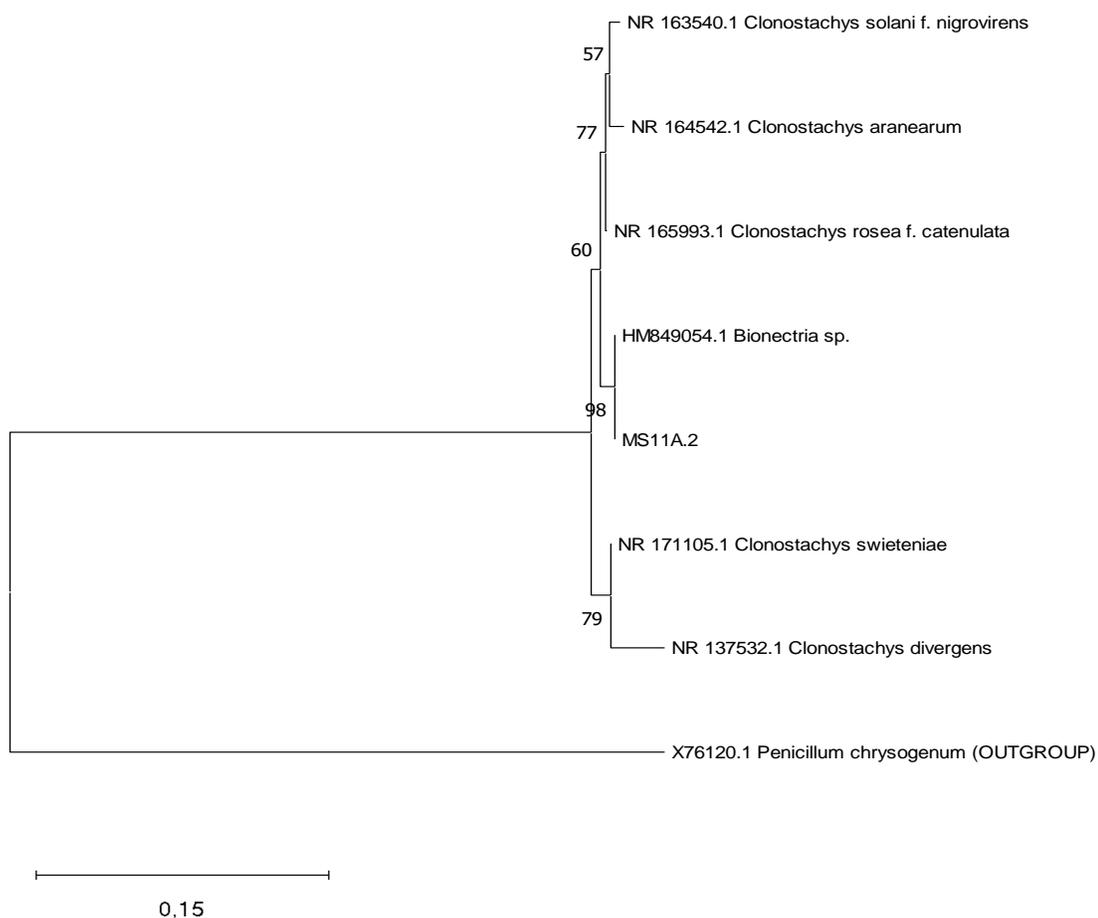
Código del aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión
MS11A.2	<i>Bionectria sp.</i>	100	HM849054.1
	<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>catenulata</i>	98.79	NR_165993.1
	<i>Clonostachys araneorum</i>	98.20	NR_164542.1
	<i>Clonostachys swieteniae</i>	97.99	NR_171105.1
	<i>Clonostachys solani</i> f. <i>nigrovirens</i>	97.98	NR_163540.1

Nota: Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejor hit respecto a la muestra.

El árbol filogenético mostrado en la Figura 5, se construyó a partir del alineamiento múltiple de la secuencia del aislado MS11A.2 con las secuencias obtenidas de las bases de datos. Este árbol no brinda información clara de la filogenia del aislado MS11A.2 ya que no forma clados concisos para cada especie, pero ya que este se agrupa con las especies del generó *Clonostachys* se puede deducir que formar parte del mismo, aunque se encuentra estrechamente relacionado con *Bioncetria* sp.

Figura 5

Árbol filogenético de aislados del género *Clonostachys* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2+G; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

Las especies con las que se presentó porcentajes de identidad más altos fueron con *Torula ligniperda* y *Xylogone sphaerospora* con el 99.27% y 94.63% respectivamente como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Xylogone.

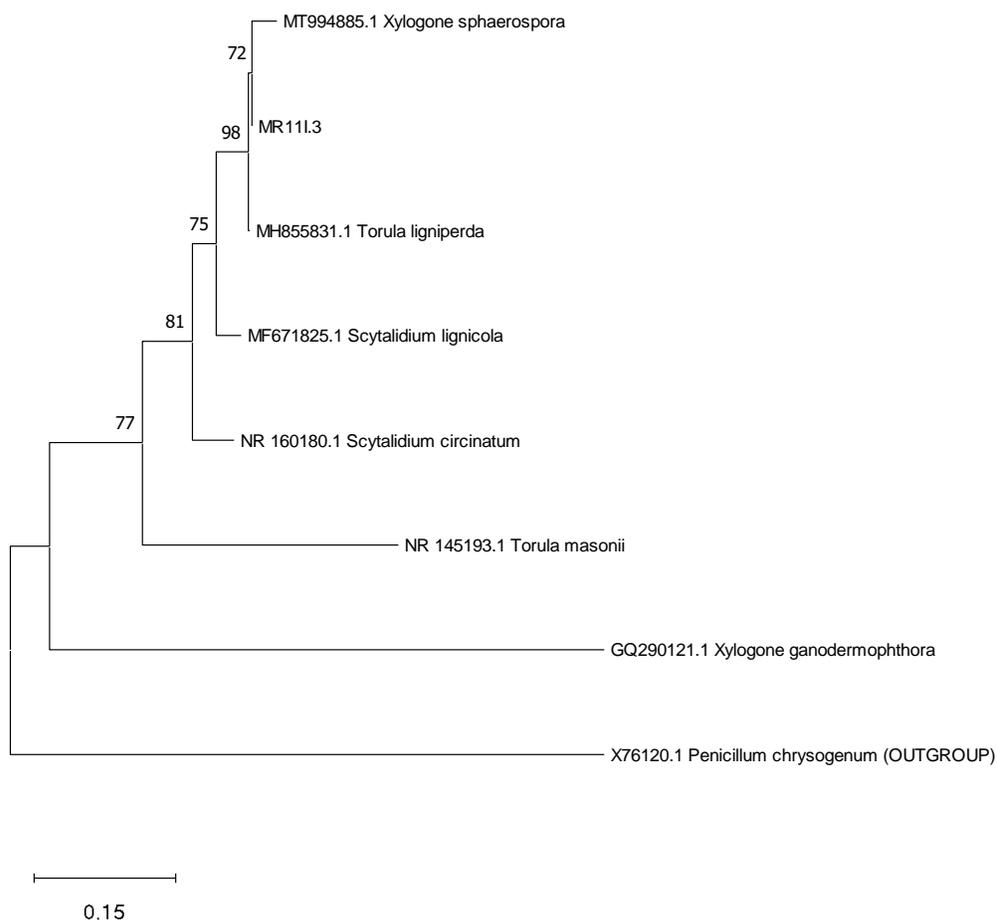
Código del aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión
	<i>Torula ligniperda</i>	99.27	MH855831.1
MR111.3	<i>Xylogone sphaerospora</i>	94.63	NR_145360.1
	<i>Scytalidium circinatum</i>	88.18	NR_160180.1

Nota. Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejor hit respecto a la muestra.

En la Figura 6, se muestra el árbol genético producto del alineamiento múltiple, en el cual el aislado MR111.3 se asocia en un mismo clado con la especie *Xylogone sphaerospora*.

Figura 6

Árbol filogenético de aislados del género *Xylogone* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

En la Tabla 11 se muestra que el aislado MS111.4 y MG211.7 pertenecen al género *Lasiodiplodia*, para el aislado MS111.4 el mejor porcentaje de similitud es 99.81% con la especie *Lasiodiplodia brasiliensis* y con respecto a MG211.7 coincide en un 99.58% con las especies *Lasiodiplodia brasiliensis*, *Lasiodiplodia parva* y *Lasiodiplodia theobromae*.

Tabla 11

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Lasiodiplodia.

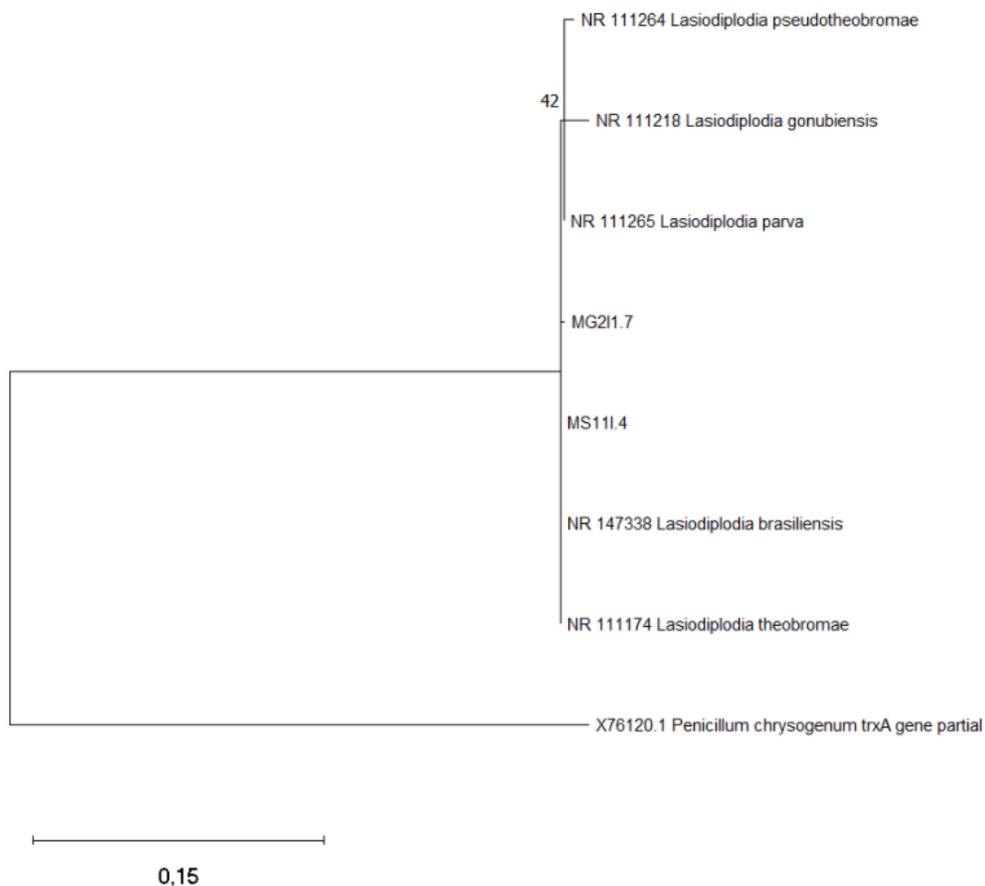
Código del aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión
MS111.4	<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>	99.81	NR_147338.1
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99.81	NR_111174.1
	<i>Lasiodiplodia parva</i>	99.62	NR_111265.1
MG211.7	<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>	99.58	NR_147338.1
	<i>Lasiodiplodia parva</i>	99.58	NR_111265.1
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99.58	NR_111174.1

Nota: Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejores hits respecto a la muestra.

A partir del alineamiento múltiple con las secuencias con mayor similitud obtenidas de la base de datos NCBI se construyó el árbol filogenético como se muestra en la Figura 7, donde se observa que los aislados MS111.4 y MG211.7 forman clados con ninguna especie en específico sin embargo si se agrupan con las especies de *Lasiodiplodia*, por lo que se considera que estos aislados pertenecen a este género.

Figura 7

Árbol filogenético de aislados del género *Lasiodiplodia* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

En la tabla 12, se puede observar que el aislado MS121.1 presenta un mayor porcentaje de similitud con la especie *Neurospora terricola* con un porcentaje de identidad del 100%, seguido de *Neurospora tetraspora* con un 99.61%.

Tabla 12

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Neurospora.

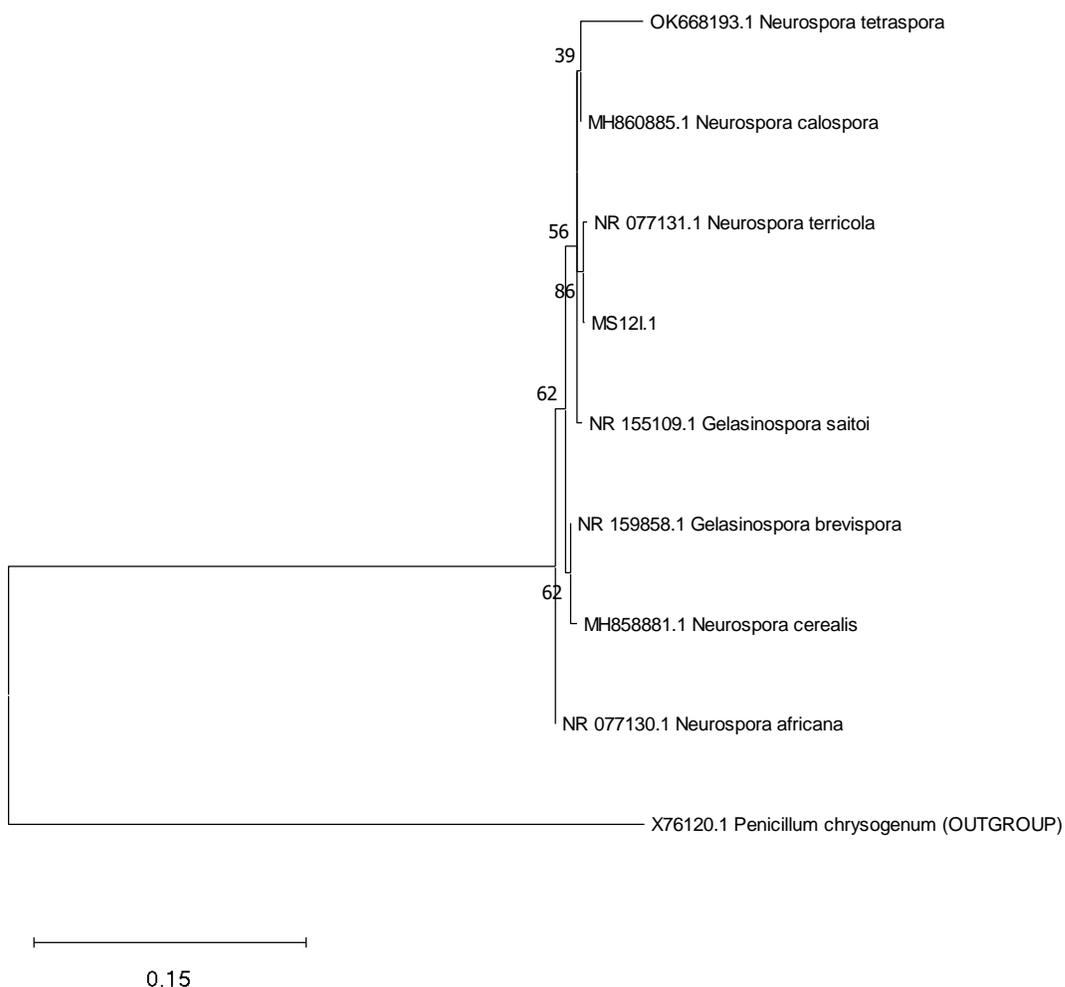
Código del aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° de Accesoión
MS121.1	<i>Neurospora tetraspora</i>	99.61	NR_077163.1
	<i>Neurospora dictyophora</i>	99.41	NR_163513.1
	<i>Gelasinospora saitoi</i>	99.22	NR_155109.1
	<i>Gelasinospora brevispora</i>	99.02	NR_159858.1
	<i>Neurospora terricola</i>	100	NR_077131.1

Nota: Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejores hits respecto a la muestra.

El árbol filogenético mostrado en la Figura 8 construido a partir de las secuencias con mayor similitud denota que el aislado MS121.1 se relaciona estrechamente con la especie *Neurospora terrícola* ya que se agrupan en un mismo clado.

Figura 8

Árbol filogenético de aislados del género *Neurospora* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

El aislado MS21A.1 pertenece al género *Trichoderma*, siendo la especie *Trichoderma spirale* con un porcentaje de 99.41 la misma que exhibe mayor similitud con el aislado como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Trichoderma.

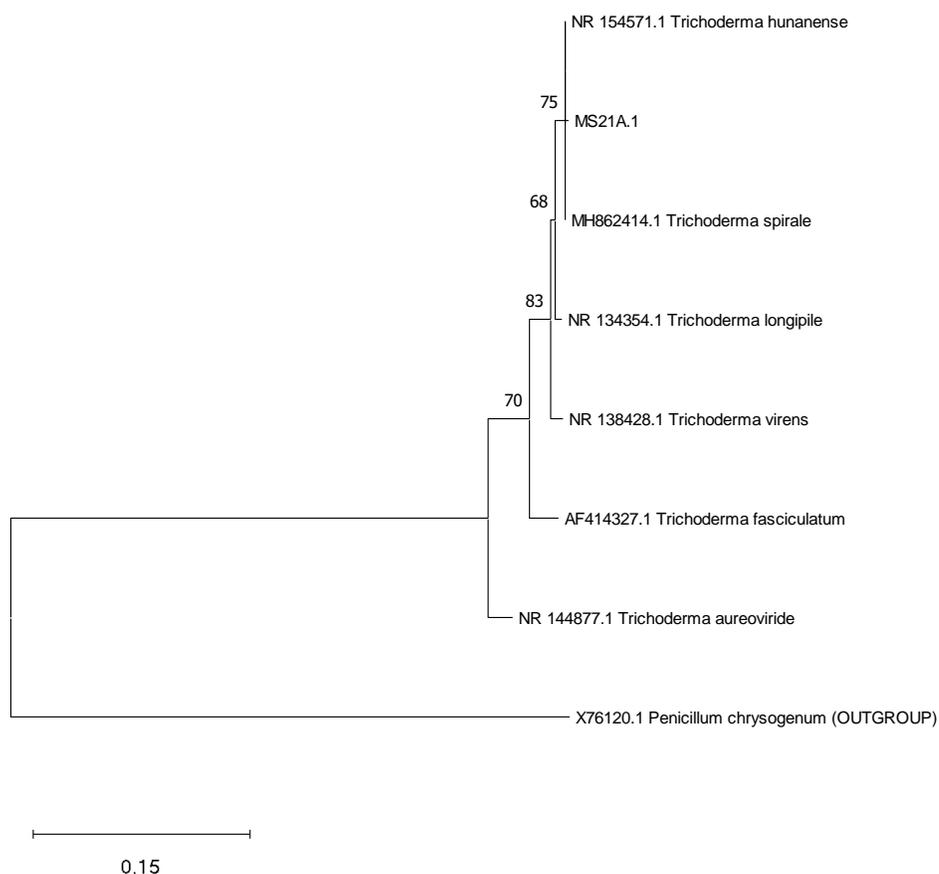
Código del aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° de Accesoión
	<i>Trichoderma spirale</i>	99.41	NR_077177.1
	<i>Trichoderma hunanense</i>	99.03	NR_154571.1
MS21A.1	<i>Trichoderma longipile</i>	98.44	NR_134354.1
	<i>Trichoderma virens</i>	97.86	NR_138428.1

Nota: Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejores hits respecto a la muestra.

A partir del alineamiento múltiple con las secuencias con mayor similitud obtenidas de la base de datos NCBI se construyó el árbol filogenético como se muestra en la Figura 9, donde se observa que el aislado MS21A.1 se encuentran estrechamente relacionados con *Trichoderma hunanense* y *Trichoderma spirale*. Lo que ratifica que este aislado pertenece a este género, pero no permite determinar la especie de la misma.

Figura 9

Árbol filogenético de aislados del género *Trichoderma* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución HKY; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

En la Tabla 14 se muestra que el aislado MG211.1, MG211.9, MS121.3 y MR411.2 pertenecen al género *Diaporthe*. Los aislados coinciden con diferentes especies siendo así que el aislado MG211.1 coincide en un 95.16% con la especie *Diaporthe longispora*, el aislado MS121.3 coincide en un 99.27% con *Diaporthe passifloricola* y los aislados MG211.9 y MR411.2 coincide en un 99.61% y 99.01% con la especie *Diaporthe miriciae*.

Tabla 14

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Diaporthe.

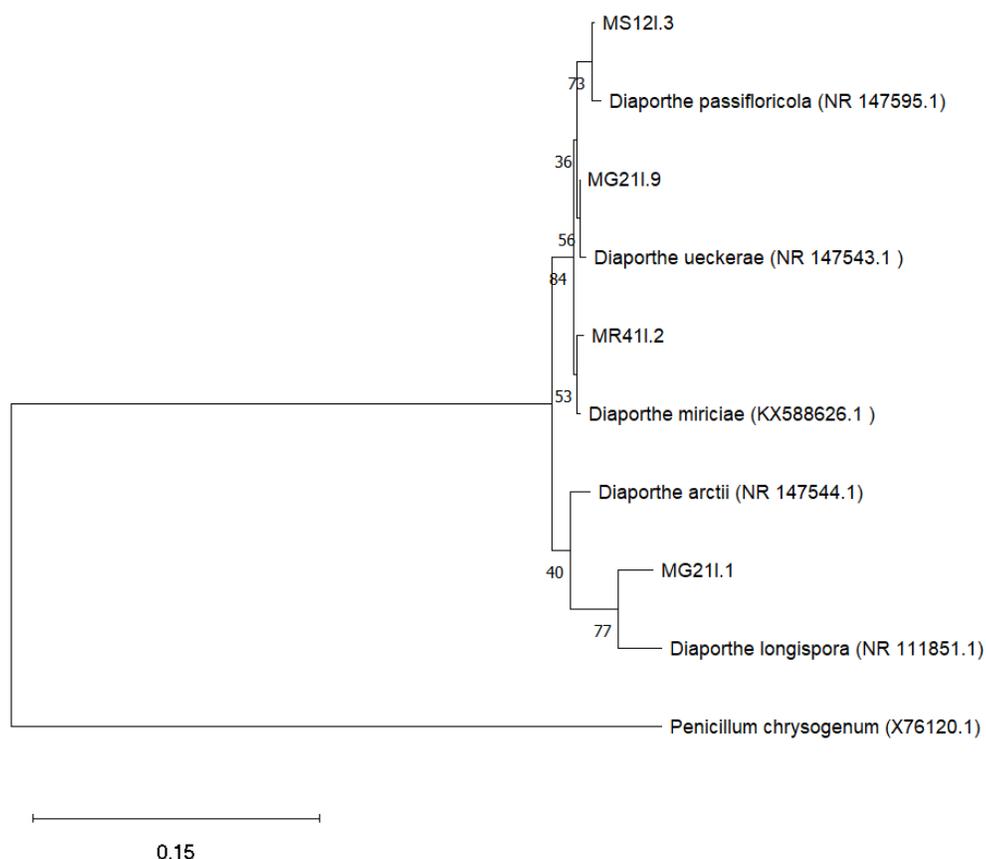
Código de aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° de accesión
MG211.1	<i>Diaporthe longispora</i>	95.16	NR_111851.1
	<i>Diaporthe arctii</i>	95.01	NR_147544.1
	<i>Diaporthe sclerotioides</i>	95.27	NR_111069.1
MG211.9	<i>Diaporthe miriciae</i>	99.61	NR_147535.1
	<i>Diaporthe ueckerae</i>	99.42	NR_147543.1
	<i>Diaporthe rosae</i>	99.02	NR_172401.1
MS121.3	<i>Diaporthe passifloricola</i>	99.27	NR_147595.1
	<i>Diaporthe miriciae</i>	98.02	NR_147535.1
	<i>Diaporthe longicolla</i>	98.19	NR_144924.1
MR411.2	<i>Diaporthe miriciae</i>	99.01	NR_147535.1
	<i>Diaporthe ueckerae</i>	98.82	NR_147543.1
	<i>Diaporthe rosae</i>	99.20	NR_172401.1

Nota: Los números de accesión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejores hits respecto a la muestra.

En la Figura 10, el árbol filogenético construido a partir de las secuencias con mayor similitud muestra que el aislado MG211.9 se relaciona estrechamente con la especie *Diaporthe longispora*, el aislado MG211.9 se relaciona estrechamente con la especie *Diaporthe ueckerae*, el aislado MS121.3 se relaciona con *Diaporthe passifloricola* y el aislado MR411.2 se relaciona estrechamente con *Diaporthe miriciae*.

Figura 10

Árbol filogenético de aislados del género *Diaporthe* basado en secuencias de la región ITS.



Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2+G; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

En la Tabla 15, se muestra las secuencias con mayor similitud obtenidas de las bases de datos Fusarium ID, Fusarium MLST y NCBI. Según la base de datos Fusarium ID, los aislados MG111.1, MG211.3, MG211.11, MR211.1 y MR311.5 coinciden en un 95.18, 100, 95.40, 95.12, 95.39 % respectivamente, para el complejo de especies *F. incarnatum-equiseti*; los aislados MG21A.1, MG211.2, MG21A.4, MR111.2, MR311.3, MS11A.3, MS12A.2 y MS211.3 presentan los porcentajes de similitud 97.77, 97.99, 97.95, 97.60, 97.43, 97.46, 96.74 y 96.53 % respectivamente para *F. solani*.

Así también la comparación de los aislados en la base de datos Fusarium MLST muestran un 100% de similitud para los aislados MG111.1, MR211.1 y MR311.5 para especie de complejo *F. oxysporum*; los aislados MG21A.1, MG211.2 y MG21A.4 muestran 100% de similitud para *Fusarium falciforme*; el aislado MG211.3 pertenece al complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* con un porcentaje de coincidencia de 99.36%; el aislado MR111.2 presentan un 98.34% de pertenencia para el complejo de *F. solani*; los aislados MS11A.3, MS12A.2 y MS211.3 muestran porcentajes de 97.08, 96.92 y 98.23 respectivamente para *Fusarium* sp.

Por otro lado, al comparar con la base de datos de NCBI, el aislado MG111.1 presenta un 98.38% de similitud para *Fusarium pseudoanthophilum*; los aislados MG211.11, MR211.1 y MR311.5 pertenecen a *Fusarium circinatum* con porcentajes de 98.34, 98.78, 98.84 respectivamente; los aislados MG21A.1, MG211.4 se muestran porcentajes de similitud de 100 y 99.81 para *Fusarium falciforme*, los aislados MS11A.3 y MS12A.2 presentan porcentajes de similitud de 99.02 y 98.01 para la especie de *Fusarium croci*; los aislados MR111.2 y MR311.3 muestran porcentajes de similitud de 97.21 y 97.44 para *F. solani* el aislado MG211.2 exhibe un porcentaje de similitud 97.99 de pertenencia para *Fusarium ambrosium*; el aislado MG211.3 exhibe una similitud del 99.79% para *Fusarium irregulare* y el aislado presenta el 98.98% de similitud para *Fusarium martii*.

Tabla 15

Secuencias con porcentajes de identidad significativos para aislados del género

Fusarium.

Código de aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión	Base de datos
MG11I.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	U34566.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium pseudoanthophilum</i>	98.38	NR_163682.1	NCBI
	Complejo de especies- <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	95.18	NRRL43730	Fusarium ID
MG21A.1	<i>Fusarium falciforme</i>	100	EU329678.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium falciforme</i>	100	NR_164424.1	NCBI
	<i>Fusarium solani</i>	97.77	HM214456.1	Fusarium ID
MG21I.2	<i>Fusarium falciforme</i>	100	EU329678.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium ambrosium</i>	97.99	NR_173405.1	NCBI
	<i>Fusarium solani</i>	97.99	GU586832.1	Fusarium ID
MG21I.3	Complejo de especies- <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	99.36	GQ505679	Fusarium MLST
	<i>Fusarium irregulare</i>	99.79	NR_164595.1	NCBI
	Complejo de especies- <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	100	NRRL43694	Fusarium ID
MG21I.11	Complejo de especies- <i>Fusarium circinatum</i>	98.84	NR_120263.1	NCBI
	<i>Fusarium incarnatum</i>	95.40	NRRL43730	Fusarium ID
MR11I.2	Complejo de especies- <i>Fusarium solani</i>	98.34	EU329678	Fusarium MLST
	<i>Fusarium solani</i>	97.21	NR_163531.1	NCBI

Código de aislado	Especie	Porcentaje de Identidad (%)	N° Accesoión	Base de datos
MR21I.1	<i>Fusarium solani</i>	97.6	GU586832.1	Fusarium ID
	Complejo de especies - <i>Fusarium oxysporum</i>	100	DQ790536	Fusarium MLST
	<i>Fusarium circinatum</i>	98.78	NR_120263.1	NCBI
	Complejo de especies - <i>F. incarnatum-equiseti</i>	95.12	NRRL43730	Fusarium ID
MR31I.3	<i>Fusarium solani</i>	97.44	NR_163531.1	NCBI
MR31I.5	<i>Fusarium solani</i>	97.43	GU586832.1	Fusarium ID
	Complejo de especies - <i>Fusarium oxysporum</i>	100	DQ790539	Fusarium MLST
	<i>Fusarium circinatum</i>	98.84	NR_120263.1	NCBI
	Complejo de especies - <i>F. incarnatum-equiseti</i>	95.39	NRRL43730	Fusarium ID
MS11A.3	<i>Fusarium sp.</i>	97.08	DQ790547.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium croci</i>	99.02	NR_163290.1	NCBI
	<i>Fusarium solani</i>	97.46	GU586832.1	Fusarium ID
MS12A.2	<i>Fusarium sp.</i>	96.92	DQ790547.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium croci</i>	98.01	NR_163290.1	NCBI
	<i>Fusarium solani</i>	96.74	HM214456.1	Fusarium ID
MS21I.3	<i>Fusarium sp.</i>	98.23	MH582405.1	Fusarium MLST
	<i>Fusarium martii</i>	98.98	NR_170722.1	NCBI
	<i>Fusarium solani</i>	96.53	HM214456.1	Fusarium ID

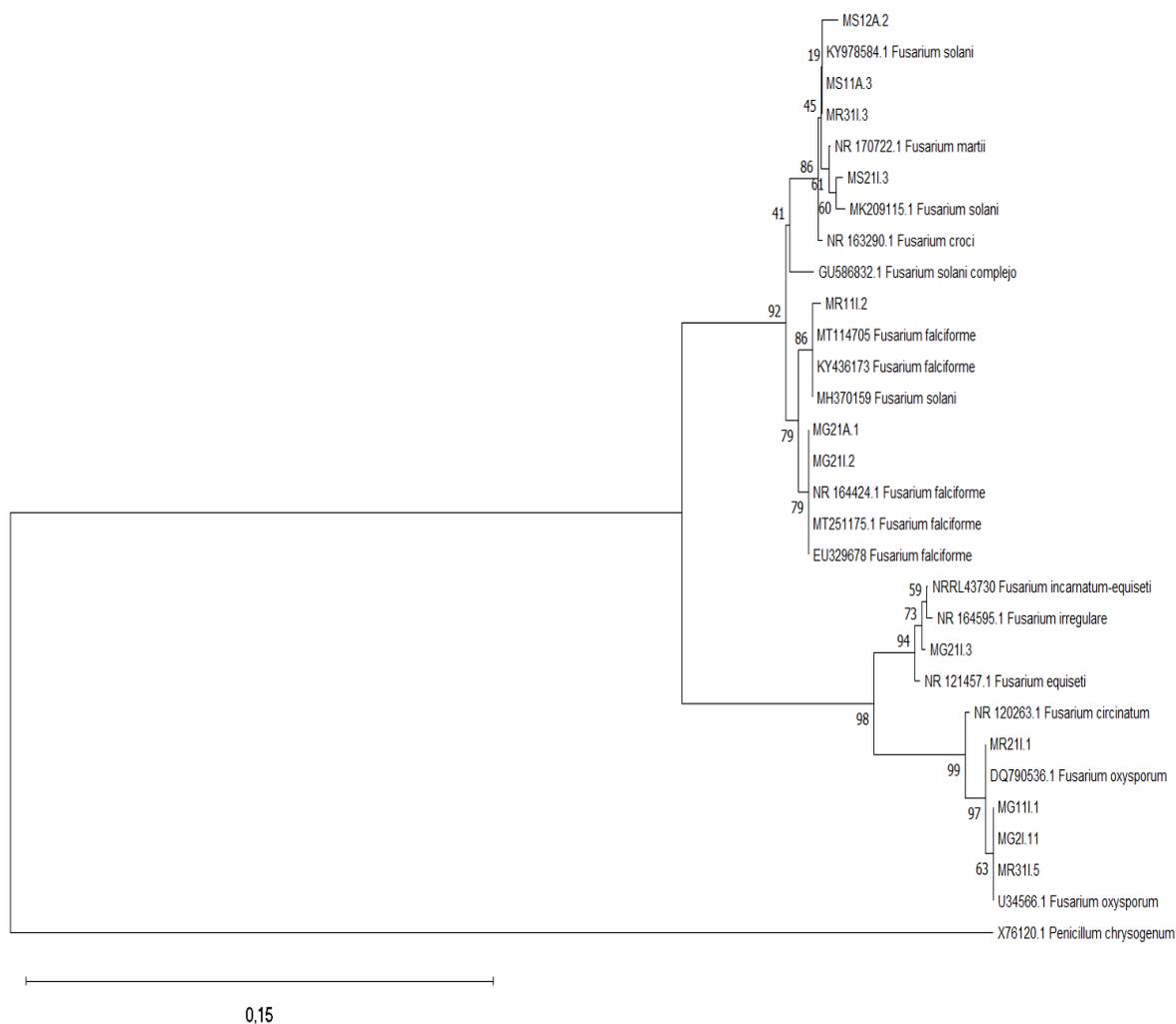
Nota: Los números de accesoión mostrados en la tabla pertenecen a las secuencias con mejores hits respecto a la muestra.

A partir del alineamiento múltiple con las secuencias con mayor similitud obtenidas de la base de datos NCBI, Fusarium ID y Fusarium MLST se construyó el árbol filogenético como se muestra en la Figura 10, donde se observa que los aislados MR311.3, MS12A.2, MS11A.3 y MS211.3 se encuentran relacionados con la especie *F. solani*; por otro lado, los aislados MG21A.1, MG211.2 y MR111.2 se encuentran formando parte del clado de *F. falciforme*. Además, se observa que el aislado MG211.3 forma parte del complejo de especies de *F. incarnatum-equiseti* y se encuentra relacionado con *F. irregulare*. Finalmente, para los aislados MG111.1, MR311.5, MG211.11 y MR211.1 se puede observar que se encuentran relacionados con *F. oxysporum* ya que se encuentran formando parte de un mismo clado.

En el clado formado por las especies de *F. falciforme*, se muestra que las muestras MG21A.1 y MG211.2 se agrupa en un subclado diferente a la muestra de MR111.2, lo que indica la existencia de diversidad genética en esta especie.

Figura 11

Árbol filogenético de aislados del género *Fusarium* basado en secuencias de la región ITS.



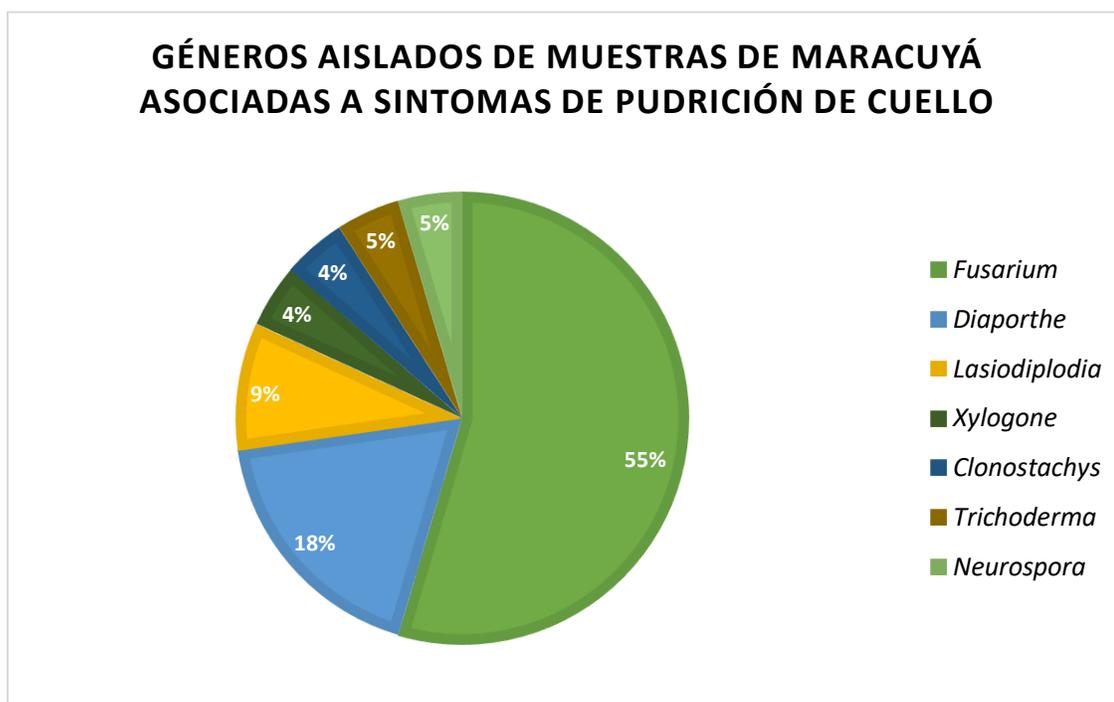
Nota. Para la elaboración de este árbol filogenético se aplicó el método ML con el modelo de evolución K2+G; grupo externo *Penicillium chrysogenum*.

Distribución de los Hongos Aislados por Género

Como se muestra en la Figura 12, las especies de hongos que se encuentran con mayor frecuencia asociadas a la enfermedad de pudrición de cuello en maracuyá con un 55% respecto al total de hongos aislados pertenecen al género *Fusarium*, seguido se encuentran de los géneros *Diaporthe* con un 18% y *Lasiodiplodia* 9% y con menor frecuencia se encontró especies de los géneros *Xylogone*, *Clonostachys*, *Trichoderma* y *Neurospora* representado un 4% de los aislados.

Figura 12

Distribución de los hongos aislados de muestras de maracuyá a síntomas de pudrición de cuello por género.

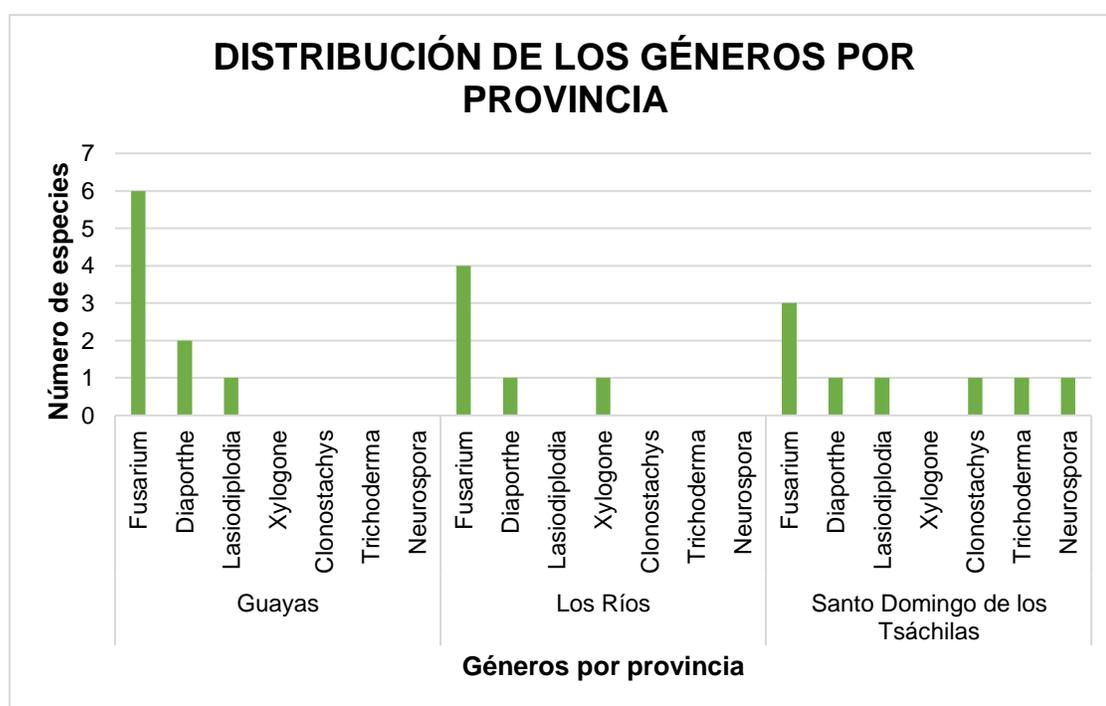


En cuanto a la distribución de por cada provincia la Figura 13, se observa que los géneros *Fusarium* y *Diaporthe* se encuentran presentes en las tres provincias muestreadas.

Adicionalmente, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se logró aislar mayor diversidad de hongos ya que en este se encuentran seis géneros de hongos: *Fusarium*, *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*, *Clonostachys*, *Trichoderma* y *Neurospora*.

Figura 13

Frecuencia de los hongos aislados de las muestras de maracuyá asociadas a síntomas de pudrición de cuello de acuerdo a su género por cada provincia.



Encuesta

La encuesta realizada a los productores permitió conocer que la mayoría dedica de 0.78 a 1.84 ha al cultivo de maracuyá, las semillas cultivadas tienen su origen en la selección propia del agricultor. Un 36% de los cultivos no se encuentra asociado con ninguna plantación y un 46% de los cultivos son asociados con plantas de cacao.

Los factores que consideran afectan al cultivo de maracuyá son la zona, condiciones ambientales, prácticas agrícolas inadecuadas y en pocos casos el material de siembra. La tabulación de los datos reportados se encuentra en el Anexo 2.

Capítulo V: Discusión

En el presente trabajo se realizó el aislamiento e identificación de hongos asociados a la sintomatología de pudrición de cuello en maracuyá, enfermedad que provoca una disminución importante en cuanto a la productividad y lleva a los agricultores a la migración constante de los cultivos hacia zonas libres de patógeno (Fischer & Rezende, 2008), se conoce que *F. solani* es el patógeno responsable de la pudrición de cuello, comienza su colonización en el tallo y se puede extender de 10 a 20 cm por encima del cuello de la planta, además de infectar la raíz principal (Fischer & Rezende, 2008; Ortiz et al., 2014); razón por la cual la muestra sobre la que se trabajó comenzaba en la base del tallo y se extendió hasta 15 cm por encima de la misma.

Dentro de la fitopatología, la identificación del organismo es un paso clave ya que permite definir métodos de prevención de enfermedades y así prevenir el daño en cultivos agrícolas. La clasificación e identificación de los hongos se hace tradicionalmente basándose en el análisis de las características macroscópicas y estructuras microscópicas como esporas, los cuerpos fructíferos y soma (Agrios, 2005). No obstante, la identificación morfológica presenta algunas dificultades como la presencia de especies cripticas, cambios en las características morfológicas debido a las condiciones a las que se le someta, así también se puede considerar como otro punto en contra la demanda de gran cantidad de tiempo y conocimiento. Por lo que es importante utilizar tanto un enfoque fenotípico como molecular (Hyde et al., 2011; Senanayake et al., 2020).

De los 22 aislados obtenidos 12 aislamientos pertenecen al género *Fusarium* lo que equivale a un 55 % del total de los aislados (Figura 12). Los mismos que se caracterizaron por presentar micelio de apariencia algodonosa de color blanco con ligera tonalidad moradas o rosadas y presencia microconidias, macroconidias y

clamidosporas, características descritas en las Tablas 5,6 y 7, para los aislados MG11I.1, MG21I.11, MG21I.2, MG21I.3, MG21A.1, MG21A.2, MR11I.2, MR2I.1, MR31I.3, MS11A.3, MS21I.3, MS12A.2 y MR31I.5; mismas que coinciden con lo descrito en el Manual de Laboratorio de *Fusarium* de Leslie y Summerell del 2006. Adicional a estos se diferenciaron a los géneros *Trichoderma* por su micelio y formación de anillos concéntricos; y *Lasiodiplodia* debido a la presencia de conidios bicelulares de color café, lo que concuerda con lo descrito en Philips y colaboradores (Phillips et al., 2013).

Dado que la caracterización morfológica permitió distinguir únicamente los aislados hasta el género en algunos casos, fue importante complementar del trabajo con la amplificación y secuenciación de la región ITS.

De la comparación de las secuencias mediante la herramienta BLAST se identificó que 4 aislados MR31I.3, MS12A.2, MS11A.3 y MS21I.3 con porcentajes de similitud mayores al 97% pertenecían a la especie *F. solani*, dato que se confirmó con el árbol filogenético armado para los aislado del género *Fusarium* (Figura 10) en el que se observa una estrecha asociación con secuencias anotadas en la base de datos GenBank con números de acceso KY978584.1 y MK209115.1. Se conoce que el agente causal de la pudrición de cuello en maracuyá es *F. solani* por lo que la presencia esta especie concuerda con reportes en China (Zhou et al., 2021) Brasil, Uganda, Venezuela Taiwan (Fischer & Rezende, 2008) en los que se logró aislar *F. solani* de plantas con sintomatología referente a la pudrición de cuello en maracuyá.

Por otra parte, la especie *F. oxysporum* fue identificada para los aislados MG11I.1, MR31I.5, MG21I.11 y MR21I.1 cuyos porcentajes de similitud fueron mayores al 99% (Tabla 15); lo cual se confirmó con el árbol filogenético (Figura 10) mismo en el que se observa que estos se encuentran asociados en mismo clado junto anotadas en Gen Bank para aislados en el que se observa una estrecha asociación con estas

mismas especies con números de accesión KY978584.1 y MK209115.1. Si bien *F. oxysporum* no es el agente causal de esta patología, si ha sido reportado en cultivos de maracuyá asociado a la enfermedad de marchitez (Fischer & Rezende, 2008; Knight & Sauls, 1994) presencia se puede deber a que tanto las patologías de marchitez como pudrición de cuello presentan síntomas similares como son: la clorosis, defoliación, marchitez y decoloración de haces vasculares (Ortiz & Hoyos, 2012).

Otra de las especies de *Fusarium*, encontradas en este estudio es *Fusarium falciforme*, del que si bien no existen reportes asociados a el maracuyá o a plantas de la familia Passifloraceae. al formar parte del complejo de especies de *Fusarium solani* (FSSC) y en otros estudios ha sido considerada como una morfoespecie politípica de *F. solani* (O'Donnell et al., 2015; Rentería-Martínez et al., 2018). Sin embargo, en los últimos años han aparecido informes en los que se define a *F. falciforme* como el patógeno causante de marchitamiento en cultivos como cebolla (Tirado-Ramirez et al., 2021), frijol(Díaz-Nájera et al., 2021), sandía (Rentería-Martínez et al., 2017) y crisantemos (Thao et al., 2021).

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* ha sido confirmado para el aislado MS111.4, según estudios reportados por Mohali (1995) este es el causante de la muerte regresiva de vides en maracuyá y otras frutas(Picos-Muñoz et al., 2015). *L. theobromae* es un hongo parasito facultativo con una amplia gama de hospedadores, aprovecha las heridas, deficiencias nutricionales y situaciones de estrés hídrico para convertirse en patógeno (Cañizares & Jaramillo, 2015; Mondragón et al., 2021). Aunque el hongo *Lasiodiplodia parva* no se ha reportado en maracuyá, en general las especies de *Lasiodiplodia* son comunes en regiones tropicales y subtropicales (Correia et al., 2016; Picos-Muñoz et al., 2015).

El aislado MS1A.2 presenta 100% de similitud (Tabla 5) y una estrecha relación con la secuencia HM849054.1 de *Bioncetria* sp. por lo que se considera que el hongo

aislado pertenece a este género. La presencia de este hongo entre los aislados obtenidos de maracuyá se puede deber a que los organismos que conforman el género *Bionectria*; son hongos comunes del suelo y se los puede encontrar en sustratos leñosos con poco tiempo de muerte (Moreira et al., 2016). De manera que el maracuyá al ser una planta semileñosa (Cañizares & Jaramillo, 2015) se vuelve un sustrato adecuado para este género. Cabe aclarar que la relación cercana observada en la Tabla 9 con especies del género *Clonostachys* se debe a que *Bionectria* es el nombre con el que se conoce al teleomorfo y *Clonostachys* al anamorfo en este género (Rossman et al., 2013).

Además de los hongos patógenos descritos anteriormente también se obtuvo aislados que correspondían a hongos endófitos los mismo que son conocidos como microorganismos que pueden vivir en tejidos de varias plantas sin causar ninguna enfermedad en el huésped (Sánchez-Fernández et al., 2013). Dentro de la lista mundial de hongos endófitos se puede encontrar a los géneros *Neurospora*, *Fusarium*, *Diaporthe* y *Trichoderma* (Rashmi, 2019) mismos géneros que coinciden con los aislados en este estudio. Asimismo, también dentro de esta lista se encuentra la especie *Diaporthe miriciae* que coincide con el aislado MG211.9 y la especie *Trichoderma spirale* que coincide con el aislado MS21A.1.

Los hongos del género *Diaporthe* pueden ser patógenos, endófitos o saprobios. Y si bien algunas de las especies de *Diaporthe* están ampliamente asociadas con tizones, canchales, muerte regresiva, melanosis y pudriciones del extremo del tallo, se sabe que *Diaporthe passifloricola* y *Diaporthe longispora* son endófitos en algunas especies de plantas como *Citrus grandis* y en plantas leñosas (Dong et al., 2021). Por otra parte, no existen reportes la especie *Diaporthe ueckerae* en *P. edulis*; no obstante, se conoce que es el causante de cancro de tallo en soja (López-Cardona et al., 2021), pitahaya (Wang et al., 2021) y muerte regresiva en *Michelia shiluensis* (Yi et al., 2018).

El aislado MR111.3 según lo observado en el árbol filogenético (Figura 6) se agrupa con aislados de la especie *Xylogona sphaerospora*. Si bien este hongo no ha sido reportado en Passifloraceas, en los pocos estudios en los que se ha visto involucrado este hongo ha podido ser aislado tanto de muestras de plantas (Turbat et al., 2020) como de hongos (Lee et al., 1996) y suelo (Mtibaà et al., 2017). Adicionalmente cabe mencionar que este hongo que puede promover el crecimiento de plantas (Turbat et al., 2020).

Capítulo VI: Conclusiones

Se logró aislar 23 hongos a partir de muestras del tallo de plantas de maracuyá afectadas por la pudrición de cuello mediante el uso de técnicas microbiológicas.

Mediante el uso de técnicas tanto microbiológicas como moleculares, se logró identificar que los aislados pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Diaporthe*, *Trichoderma*, *Lasiodiplodia*, *Bionectria*, *Neurospora* y *Xylogone*.

Cuatro de los 23 aislados correspondieron a *F. solani*, el cual es reportado como el agente causal de la pudrición de cuello en maracuyá.

El análisis de los árboles filogenéticos permitió confirmar la identidad de los organismos aislados, así como también confirmar la relación que guardan los organismos de un mismo género. Especialmente en el caso de *Fusarium* en el que se logró distinguir 2 clados principales en los cuales se encontraban los complejos de especies *F. solani* y *F. oxysporum*.

Capítulo VII: Recomendaciones

En el caso de observarse contaminación por ácaros especialmente durante el primer paso de aislamiento, descartarse inmediatamente las placas afectadas.

Utilizar otros marcadores moleculares (EF-1, COX-II, TUB, CAL) que permitan confirmar la identidad de los hongos aislados, así como también ayudar a definir la especie a la que pertenecen.

Realizar los postulados de Koch para identificar los aislados que están afectando a los cultivos de maracuyá y que se encuentran relacionados con a la sintomatología de pudrición de cuello.

Estudiar la asociación y efecto de los hongos aislados en este trabajo en el desarrollo de la enfermedad de pudrición de cuello en maracuyá.

Referencias

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press .
- AGROCALIDAD. (2018). *Toma de muestras para el Laboratorio de Fitopatología*.
- Almeida, A., Jososki, A., Silva, A., Pio, A., Martins, A., Costa, A., Silva do Nascimento, A., Silva, A., Kimus, A., Appezzato, B., Tupinamaba, D., Oliveira, D., Scaranari, C., Horst, C., & Ruggiero, C. (2005). *Maracuja germoplasma e melhoramento genético* (F. Gelape, N. Vilela, & M. Fideles, Eds.; Embrapa).
- Alves, A., John, A., & Phillips, L. (n.d.). *Morphological and molecular data reveal cryptic species in Lasiodiplodia theobromae* *Microbial communities thriving in arsenic contaminated ecosystems : structural and functional biodiversity* *View project* *Genera of Phytopathogenic Fungi (GoPhy) View project*.
<https://www.researchgate.net/publication/40095352>
- Angarita Merchán M., Torres Caicedo, M., & Díaz Torres, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796–807.
- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadia, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493–504.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>
- Bueno, C. J., Fischer, I. H., Rosa, D. D., Firmino, A. C., Harakava, R., Oliveira, C. M. G., & Furtado, E. L. (2014). *Fusarium solani* f. sp. *passiflorae*: A new forma specialis causing collar rot in yellow passion fruit. *Plant Pathology*, 63(2), 382–389.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12098>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS* (Centro Int).

- Cañizares, A., & Jaramillo, E. (2015). El cultivo de maracuyá en Ecuador. In *Universidad Técnica de Machala (UTMACH)*.
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*.
<https://www.researchgate.net/publication/280731680>
- Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. (2015). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (Issue August). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-Semarnat).
- Correia, K. C., Silva, M. A., de Moraes, M. A., Armengol, J., Phillips, A. J. L., Câmara, M. P. S., & Michereff, S. J. (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*, *65*(1), 92–103. <https://doi.org/10.1111/ppa.12388>
- Díaz-Nájera, J. F., Ayvar-Serna, S., Mena-Bahena, A., Baranda-Cruz, E., Vargas-Hernández, M., Alvarado-Gómez, O. G., & Fuentes-Aragón, D. (2021). First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Wilt Disease of *Phaseolus vulgaris* in Mexico. *Plant Disease*, *105*(3), 710–710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1160-PDN>
- Dong, Z., Manawasinghe, I. S., Huang, Y., Shu, Y., Phillips, A. J. L., Dissanayake, A. J., Hyde, K. D., Xiang, M., & Luo, M. (2021). Endophytic Diaporthe Associated With *Citrus grandis* cv. Tomentosa in China. *Frontiers in Microbiology*, *11*.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609387>
- Duarte, Y., Echevarría, A., & Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, *31*(3), 173–183.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000300004

- Fischer, I. H., Almeida, A. M. de, Fileti, M. de S., Bertani, R. M. de A., Arruda, M. C. de, & Bueno, C. J. (2010). Avaliação de Passifloraceas, fungicidas e Trichoderma para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(3), 709–717. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000090>
- Fischer, I., & Rezende, J. (2008). Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.). *Pest Technol*, 2(1), 1–19.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/Jid.2013.1>, 3, 1–4.
- Geiser, D., Jiménez-Gasco, M. D. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A., & O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5–6), 473–479. <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31(1), 1–41. <https://doi.org/10.3767/003158513X666844>
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859. <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Henao-Henao, E. D., Hernandez-Medina, C. A., Salazar-González, C., Velasco-Belalcázar, M. L., & Gómez-López, E. D. (2018). Identificación molecular de aislamientos de Fusarium asociados a maracuyá en el Valle del Cauca, Colombia. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 53. <https://doi.org/10.15517/ma.v29i1.27114>

- Hyde, K. D., Abd-Elsalam, K., & Cai, L. (2011). Morphology: still essential in a molecular world. *Mycotaxon*, 114(1), 439–451. <https://doi.org/10.5248/114.439>
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Ruppy, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 87–109. <https://academic.oup.com/mmy/article/40/1/87/961355>
- Jong Kyu Lee, Gyung-Ja Cho, Kwang-Yun Cho, & Se-Jong Oh. (1996). Xylogone sphaerospora, a New Fungal Pathogen of Cultivated Ganoderma lucidum. *The Korean Journal of Mycology*.
https://www.researchgate.net/publication/264030708_Xylogone_sphaerospora_a_New_Fungal_Pathogen_of_Cultivated_Ganoderma_lucidum
- Knight, R. J., & Sauls, J. W. (1994). *The Passion Fruit*.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Blackwell).
- Liu, Z.-L., Zhou, S., Huang, Y., Yang, L., Yan, Y., Chen, G., Sun, J. M., Wu, S., & Chen, X. (2021). First Report of Fruit rot Caused by *Phytophthora nicotianae* on Passion Fruit in Guangxi Province, China. *Plant Disease*, 1–5. <https://doi.org/10.1094/pdis-03-21-0646-pdn>
- López-Cardona, N., Guevara-Castro, A., Gañán-Betancur, L., & Amaya-Gómez, C. v. (2021). First Report of *Diaporthe ueckerae* Causing Stem Canker on Soybean (*Glycine max*) in Colombia. *Plant Disease*, 105(12), 4162.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0718-PDN>
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., & Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Marostega, T. N., Lara, L. P., Oliveira, D. da S. de, Chimello, A. M., Gilio, T. A. S., Preisigke, S. da C., Araujo, K. L., Serafim, M. E., & Neves, L. G. (2019). Molecular

- and Aggressiveness Characterization of Isolates of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* Associated to Passion Fruit Wilting. *Journal of Agricultural Science*, 11(3), 407. <https://doi.org/10.5539/jas.v11n3p407>
- Marostega, T. N., Preisigke, S. C., Chimello, A. M., Silva, G. C., Gilio, T. A. S., Araújo, K. L., Barelli, M. A. A., & Neves, L. G. (2021). Different strategies for estimating genetic parameters for collar rot resistance characteristics in *Passiflora* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 81(3), 281–290. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392021000300281>
- Mondragón Flores, A., Rodríguez-Alvarado, G., Gmez-Dorantes², N., Guerra-Santos, J. J., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4), 643–654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>
- Moreira, G. M., Abreu, L. M., Carvalho, V. G., Schroers, H.-J., & Pfenning, L. H. (2016). Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. *Mycological Progress*, 15(10–11), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1224-6>
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). *Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP* (Instituto). <http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Mtibaà, R., de Eugenio, L., Ghariani, B., Louati, I., Belbahri, L., Nasri, M., & Mechichi, T. (2017). A halotolerant laccase from *Chaetomium* strain isolated from desert soil and its ability for dye decolourization. *3 Biotech*, 7(5), 329. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0973-5>
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future

- directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583–595. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>
- Ortiz Caranguay, E. H. (2012). Etiología de enfermedades asociadas a fusariosis en el cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims .) en la región del Sumapaz. *Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia*, 5–31.
- Ortiz, E., Cruz, M., Melgarejo, L. M., Marquínez, X., & Hoyos-Carvajal, L. (2014). Histopathological features of infection caused by *Fusarium Oxysporum* and *F. solani* in purple passionfruit plants (*Passiflora edulis* Sims). *Summa Phytopathologica*, 40(2), 134–140. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1910>
- Ortiz, E., & Hoyos, L. (2012). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6, 110–116.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. (2008). Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience*, 58(9), 799–810. <https://doi.org/10.1641/B580907>
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Ilende-Molar, Raúl. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control Paola Alejandra. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
- Postic, J., Cosic, J., Vrandecic, K., Jurkovic, D., Saleh, A. A., & Leslie, J. F. (2012). Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia.

- Journal of Phytopathology*, 160(2), 76–81. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01863.x>
- Queensland Department of Agriculture and Fisheries. (2016). Managing Passionfruit Plantations Affected by Wet Weather. *Dep. Agric. Fish*, 1–4.
- Quito-León, E. P., & García-Hevia, S. (2021). Economic and Productive Evaluation in Passion Fruit Production, Zone Vega Rivera, El Oro. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 30(2), 86–94. <https://eqrcode.co/a/D6DtES>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramírez, J., Tamayo, P. J., & Morales, J. G. (2017). Identification and pathogenicity of microorganisms affecting purple passion fruit in Colombia. *Revista Ceres*, 64(3), 250–257. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201764030005>
- Rashmi, M. (2019). A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere*, 10(1), 798–1079. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/10/1/19>
- Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Varela-Romero, A., Gutiérrez-Millán, L. E., & Meza-Moller, A. D. C. (2018). Análisis filogenético multilocus del complejo fúngico asociado a pudrición radicular de sandía en Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1710-1>
- Retana, K., Ramírez, J., Castro, O., & Blanco, M. (2018). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii ASOCIADO A LA MARCHITEZ DEL APIO EN COSTA RICA. *Agronomía costarricense*, 42(1), 115–126. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/ac/v42n1/0377-9424-ac-42-01-115.pdf>

- Rodrigues, P., Venâncio, A., & Lima, N. (2018). Toxic reagents and expensive equipment: are they really necessary for the extraction of good quality fungal DNA? *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 32–37. <https://doi.org/10.1111/lam.12822>
- Rossman, A. Y., Seifert, K. A., Samuels, G. J., Minnis, A. M., Schroers, H.-J., Lombard, L., Crous, P. W., Pöldmaa, K., Cannon, P. F., Summerbell, R. C., Geiser, D. M., Zhuang, W., Hirooka, Y., Herrera, C., Salgado-Salazar, C., & Chaverri, P. (2013). Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection. *IMA Fungus*, 4(1), 41–51. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.05>
- Salazar-González, C., Serna-Cock, L., & Gómez-López, E. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 277. <https://doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K. M., Ulloa-Benítez, Á., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2013000200006&lng=es&tlng=es.
- Senanayake, I., Rathnayaka, A., Marasinghe, D., Calabon, M., Gentekaki, E., Lee, H., Hurdeal, V., Pem, D., Dissanayake, LS., Wijesinghe SN, Bundhun D, Nguyen TT, Goonasekara ID, Abeywickrama PD., Bhunjun, Jayawardena RS, Wanasinghe DN, Jeewon, R., Bhat DJ., & 11 and Xiang MM. (2020). Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. *Mycosphere*, 11(1), 2678–2754. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/20>

- Ssekyewa, C., Opió, A. F., Swinburne, T. R., van Damme, P. L. J., & Abubakar, Z. M. (1999). Sustainable management of collar rot disease of passion fruits in Uganda. *International Journal of Pest Management*, 45(3), 173–177. <https://doi.org/10.1080/096708799227761>
- Ssekyewaa, C., Swinburne, T. R., Leo, P., Van, J., Zakia, D. •, & Abubakard, M. (1999). *Passion fruit collar rot disease occurrence in major growing districts of Uganda* (Vol. 54).
- Thao, L. D., Anh, P. T., Trang, T. T. T., Khanh, T. N., Hien, L. T., Binh, V. T. P., Thanh, H. M., & Thanh, D. T. (2021). *Fusarium falciforme*, a pathogen causing wilt disease of chrysanthemum in Vietnam. *New Disease Reports*, 43(2). <https://doi.org/10.1002/ndr2.12013>
- Tirado-Ramirez, M. A., López-Urquídez, G. A., Amarillas-Bueno, L. A., Retes-Manjarrez, J. E., Vega-Gutiérrez, T. A., López Avendaño, J. E., & López-Orona, C. A. (2021). Identification and virulence of *Fusarium falciforme* and *Fusarium brachygibbosum* as causal agents of basal rot on onion in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(5), 722–733. <https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1894241>
- Torres C., Sánchez M., Bravo., Marmolejo de la Torre F., & Gómez E. (1999). *Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de maracuya Passiflora edulis Sims var. flavicarpa.pdf* (p. 27). [http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6418/1/Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de maracuya.pdf](http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6418/1/Enfermedades_fungosas_y_bacterianas_en_el_cultivo_de_maracuya.pdf)
- Turbat, A., Rakk, D., Vigneshwari, A., Kocsubé, S., Thu, H., Szepesi, Á., Bakacsy, L., D. Škrbić, B., Jigjiddorj, E.-A., Vágvölgyi, C., & Szekeres, A. (2020). Characterization of the Plant Growth-Promoting Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Sophora flavescens*. *Microorganisms*, 8(5), 683. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050683>

- Valarezo, A., Valarezo, O., Mendoza, A., Álvarez, H., & Vásquez, W. (2014). El cultivo de Maracuyá: Manual técnico para su manejo en el Litoral Ecuatoriano. In *Manual Técnico No. 100*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1199/1/INIAP-PORTOVIEJO-650.pdf>
- Wang, C., Ye, X., Ng, T. B., & Zhang, W. (2021). Study on the Biocontrol Potential of Antifungal Peptides Produced by *Bacillus velezensis* against *Fusarium solani* That Infects the Passion Fruit *Passiflora edulis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2051–2061. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06106>
- Wang, Y.-C., Liu, J.-H., Huang, C.-C., & Hong, C.-F. (2021). First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) stem rot caused by *Diaporthe ueckerae* in Taiwan. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1902-PDN>
- Xiang, S., & Liang-Dong, G. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, 3(1), 65–76.
- Yeturu, S., Paz, L., Intriago, D., Castro, J., Álvarez, H., & Viera, W. (2018). First report of mosaic disease caused by Cucumber mosaic virus infecting passion fruit in Ecuador. In *Plant Disease* (Vol. 102, Issue 2, p. 458). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0814-PDN>
- Yi, R., Chen, Y., Han, J., Hu, Q., Li, H., & Wu, H. (2018). Identification and Biological Characteristics of *Diaporthe ueckerae* Causing Dieback Disease on *Michelia shiluensis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 54(9).
- Young, B. R. (1970). Root rot of passionfruit vine (*Passiflora edulis* Sims.) in the Auckland area. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 13(1), 119–125. <https://doi.org/10.1080/00288233.1970.10421202>
- Zhou, Y., Liu, Y., Tang, J., & Xu, X. (2021). Stem collar rot of passion fruit caused by *Fusarium solani* in Zhanjiang, China. In *Journal of Plant Pathology* (Vol. 103, Issue

2, p. 739). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.

<https://doi.org/10.1007/s42161-021-00814-4>.

Anexos